



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 102 58 400.1 ✓
Anmeldetag: 13. Dezember 2002 ✓
Anmelder/Inhaber: N.V. Nutricia, Zoetermeer/NL
Bezeichnung: Trans-Sialidasen aus Trypanosoma congolense
IPC: C 12 N, A 61 K

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 09. Januar 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

HUB

Trans-Sialidasen aus *Trypanosoma congolense*

Gegenstand der Erfindung

5

Die Erfindung betrifft neuartige Enzyme, die Sialinsäuren von einem Donormolekül (z. B. Oligosaccharide, Polysialinsäuren, glykosylierte Proteine, glykosylierte Peptide, glykosylierte Lipide (z.B. Ganglioside) und andere glykosylierte nieder- und hochmolekulare Moleküle) auf ein Akzeptormolekül (z. B. Oligo- und Polysaccharide, glykosylierte Proteine, glykosylierte Peptide, glykosylierte Lipide und andere glykosylierte nieder und hochmolekulare Moleküle) übertragen (Trans-Sialidasen). Die Enzyme wurden aus dem Einzeller *Trypanosoma congolense* isoliert.

15

Weiterhin betrifft die Erfindung funktionale Äquivalente dieser Enzyme; die für diese Enzyme und deren funktionalen Äquivalente kodierenden Nukleinsäuresequenzen; Expressionskonstrukte und Vektoren, welche diese Sequenzen enthalten; rekombinante Mikroorganismen, welche eine erfindungsgemäße kodierende Nukleinsäuresequenz tragen; Verfahren zur rekombinanten Herstellung erfindungsgemäßer Enzyme; Verfahren zur Isolierung erfindungsgemäßer Enzyme aus *Trypanosoma congolense*; Verfahren zur enzymatischen Sialisierung von Akzeptormolekülen unter Verwendung erfindungsgemäßer Enzyme; Effektoren der erfindungsgemäßen Trans-Sialidasen; die Verwendung erfindungsgemäßer Nukleinsäuresequenzen, Enzyme, Effektoren oder Sialisierungsprodukte zur Herstellung von Impfstoffen, Medikamenten, Nahrungs- oder Nahrungsergänzungsmitteln; sowie die erfindungsgemäß hergestellten Mittel selbst.

20

25

Hintergrund der Erfindung

Trans-Sialidasen können Sialinsäuren, bevorzugt alpha-2,3-gebundene Sialinsäuren, von einem Donormolekül auf ein Akzeptormolekül übertragen, wobei wiederum alpha-2,3-glykosidische Bindungen, bevorzugt an einem β -terminalen Galaktoserest, ausgebildet werden.

30

Unter dem Begriff Sialinsäuren werden alle N- und O- Derivate der Neuraminsäure zu-

sammengefasst (Blix *et al.*, 1957). Die Neuraminsäure (5-Amino-3,5-didesoxy-D-glycero-D-galacto-nonulo-pyranosonsäure) ist ein Aminozucker mit einem Rückgrat aus neun Kohlenstoffatomen, der durch die Carboxylgruppe am C-Atom 2 einen stark sauren pK-Wert von 2,2 erhält und daher unter physiologischen Bedingungen negativ geladen ist. Die unsubstituierte Form ist sehr instabil und kommt in der Natur in freier Form nicht vor (Schauer, 1982). Allerdings sind inzwischen mehr als 40 natürliche Derivate der Neuraminsäure bekannt (Schauer und Kamerling, 1997). Die beiden häufigsten in der Natur vorkommenden Sialinsäuren sind die *N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac), der Vorläufer aller glykosidisch gebundenen Sialinsäuren (Schauer, 1991) und die *N*-Glykolyneuraminsäure (Neu5Gc), die durch Hydroxylierung der Methylgruppe des *N*-Acetylrestes von CMP-Neu5Ac entsteht (Shaw und Schauer, 1988). Die Hydroxylgruppen dieser beiden Sialinsäuren können durch Acetyl-, Lactyl-, Methyl-, Sulfat- und Phosphatreste in unterschiedlicher Kombination substituiert sein, was zu der großen strukturellen Vielfalt der Sialinsäuren führt (Schauer, 1991; Schauer und Kamerling, 1997).

Der größte Teil der natürlich vorkommenden Sialinsäuren liegt gebunden als Bestandteil von Oligosacchariden, Polysacchariden und insbesondere Glykokonjugaten vor (Schauer, 1982). Es sind aber auch schon Polysialinsäuren aus transgener mikrobieller Produktion bekannt. Sialylierte Glykokonjugate kommen vor allem in der äußeren Membran der Zellen vor, sind jedoch auch wichtige Bestandteile des Serums und von mukösen Schleimen (Traving und Schauer, 1998). Die Sialinsäuren schützen Glykoproteine und Zellen vor dem Angriff durch Proteasen und anderen Enzymen und damit vor dem Abbau (Reuter *et al.*, 1988). Die sialinsäurehaltigen Schleimhäute des Magen-Darmtraktes bilden nicht nur einen wirksamen Schutz vor den Verdauungsenzymen, sondern schützen die darunter liegenden Gewebe auch vor dem Eindringen pathogener Bakterien (Kelm und Schauer, 1997).

Eine sehr wichtige Funktion üben Sialinsäuren bei molekularen und zellulären Erkennungsprozessen aus. Dabei maskieren sie Rezeptoren und verhindern so Interaktionen zwischen Rezeptoren und Liganden (Schauer, 1985; Kelm und Schauer, 1997). So schützen Sialinsäuren z. B. Serumglykoproteine und Erythrozyten vor Abbau und Phagozytose, indem sie darunterliegende Galaktosereste maskieren. Werden die endstän-

digen Sialinsäuren abgespalten, können die subterminalen Galaktosereste durch Lektine auf Hepatozyten bzw. Phagozyten gebunden werden und es kommt zur Endozytose der Serumproteine bzw. Erythrozyten. Ein weiteres Beispiel ist der Schutz körpereigener Gewebe, aber auch vieler hochsialylierter Tumore vor der Erkennung durch das Immunsystem (Pilatte *et al.*, 1993). Geht die schützende Sialinsäureschicht verloren, kann es zu Autoimmunreaktionen kommen.

Sialinsäuren dienen auch als Erkennungsstellen für körpereigene Zellen und Hormone und spielen so eine wichtige Rolle bei zellulären Interaktionen (Kelm und Schauer, 1997). Bei Entzündungen etwa exprimieren Endothelzellen auf ihrer Oberfläche Selektine, die bestimmte sialylierte Strukturen (z. B. Sialyl-Lewis X) auf Leukozyten erkennen, so dass diese an die Endothelzellen binden und in das Gewebe eindringen können (Lasky, 1995). Außerdem wird die Aktivierung der T-Zellen der humoralen Immunabwehr durch die Wirkung von Trans-Sialidasen beeinflusst (Gao *et al.*, 2001). Sialoadhäsine (Siglecs) wie das Myelin-assoziierte Glykoprotein (MAG) binden ebenfalls hochspezifisch an sialylierte Glykane (Kelm *et al.*, 1996; Crocker *et al.*, 1998). Das Myelin-assoziierte Glykoprotein ist im Nervensystem unter anderem an der Myelinisierung und an der Regulation des axonalen Wachstums beteiligt. Somit ist es nicht verwunderlich, dass jüngst festgestellt wurde, dass Trans-Sialidasen durch die Übertragung von Sialinsäuren an der Differenzierung von Nervenzellen und Gliazellen beteiligt sind (Chuenkova *et al.*, 2001). CD-22 ist ein weiterer Sialinsäure-bindender Rezeptor, der auf Lymphozyten vorkommt und das "Zwiesgespräch" von T- und B-Lymphozyten ermöglicht. Die Familie der Siglecs besteht mittlerweile aus über 10 molekularbiologisch charakterisierten Vertretern.

25

Sialinsäuren sind jedoch nicht nur bei körpereigenen Erkennungsprozessen wichtig, sondern stellen auch Rezeptoren für einige Bakterien, Viren und Toxine dar. So erfolgt z. B. die Bindung des Tetanus-Toxins an Ganglioside von Nervensynapsen über Sialinsäuren (Schauer *et al.*, 1995). Die Sialinsäure-spezifische Adhäsion über mikrobielle Lektine (Sharon und Lis, 1997) ist oft ein kritischer Schritt bei Infektionskrankheiten, etwa bei der durch einige *E. coli*-Stämme hervorgerufenen Neugeborenen-Meningitis oder bei Infektionen der Magenschleimhaut durch *Helicobacter pylori*. Vor allem die Grippeerreger Influenza A und B Viren docken über Sialinsäure an die zu infizierenden

30

Zellen an (Schauer, 2000).

Modifikationen der Sialinsäuren, insbesondere die O-Acetylierung, besitzen eine große Bedeutung bei der Regulation der molekularen und zellulären Erkennung (Schauer, 1991). So binden Influenza C-Viren spezifisch an 9-O-acetylierte Sialinsäuren auf Bronchialepithelien (Herrler *et al.*, 1985), während die O-Acetylierung eine Bindung von Influenza A- und B-Viren verhindert (Higa *et al.*, 1985). Vor allem aber ist die O-Acetylierung von Sialinsäuren sehr wichtig für die Morphogenese und Entwicklung verschiedener Gewebe (Varki *et al.*, 1991). Bei neuroektodermalen Tumoren ist sie erhöht (Hubl *et al.*, 2000; Fahr und Schauer, 2001) und bei Dickdarmkrebs erniedrigt (Corfield *et al.*, 1999). Sialinsäuren sind essentielle Modulatoren des biologischen Verhaltens von Tumoren (Schauer, 2000).

Figurenbeschreibung

Bild 1 zeigt einen Vergleich der von Aminosäureteilsequenzen der erfindungsgemäßen Trans-Sialidasen TS1 und TS2. Identische Aminosäuren in beiden Sequenzen sind dunkel markiert. Die Übereinstimmung (Identität) der beiden Teilsequenzen beträgt nur etwa 50%.

Bild 2 zeigt die verschiedenen Reaktionsweisen von Sialidase, Sialyltransferasen und Trans-Sialidasen

Bild 3 zeigt einen Vergleich der Aminosäuresequenz der Sialidase aus *Trypanosoma rangeli* (T. r. S), der Trans-Sialidase von *Trypanosoma cruzi* (T. cr. TS) und der Trans-Sialidase von *Trypanosoma brucei brucei* (T. b. br. TS) mit Teilsequenzen der beiden erfindungsgemäßen Trans-Sialidasen aus *Trypanosoma congolense* (T. con. TS1 und T. con. TS2). Aminosäuren, die in allen Sequenzen identisch sind, sind weiß auf dunkelgrauem Hintergrund dargestellt. Aminosäuren, die in mindestens 4 von den 5 Sequenzen identisch sind, sind schwarz auf Dunkelgrau gedruckt, während Aminosäuren, die in mindestens 3 der 5 Sequenzen übereinstimmen mit hellerem Grau hinterlegt sind.

Kurze Beschreibung der Erfindung

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es, neuartige Mittel bereitzustellen, mit deren Hilfe Sialinsäure-gesteuerte biologische oder patho-biologische Prozesse beeinflussbar sind.

Obige Aufgabe konnte überraschenderweise gelöst werden durch Bereitstellung neuartiger Enzyme mit Trans-Sialidase-Aktivität und der kodierenden Sequenzen davon aus *Trypanosoma congolense*.

Ein erster Gegenstand der Erfindung betrifft Polynukleotide, welche für Proteine mit Trans-Sialidase-Aktivität kodieren und aus *Trypanosoma congolense* isolierbar sind, wobei diese Proteine vorzugsweise den Transfer von Sialinsäure von einem Donor auf ein Akzeptormolekül katalysieren.

Bevorzugte Polynukleotide umfassen wenigstens eine Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1 oder 3, oder stellen Fragmente davon dar, welche wenigstens 15 zusammenhängende Nukleotidreste umfassen. Gegenstand der Erfindung sind auch die dazu komplementären Polynukleotide und Fragmente; und die von diesen Polynukleotiden durch Entartung des genetischen Codes abgeleiteten Nukleotidsequenzen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft Oligonukleotide, welche mit einem erfindungsgemäßen Polynukleotid, insbesondere unter stringenten Bedingungen, hybridisieren.

Gegenstand der Erfindung sind auch Polynukleotide, welche mit einem Oligonukleotid gemäß obiger Definition, insbesondere unter stringenten Bedingungen, hybridisieren und für ein Genprodukt aus Mikroorganismen der Gattung *Trypanosoma* kodieren.

Gegenstand der Erfindung sind auch Polypeptide, welche von einem Polynukleotid kodiert werden, das eine Nukleinsäuresequenz gemäß obiger Definition umfasst, oder welche eine Aminosäuresequenz aufweisen, die wenigstens 10 zusammenhängende Aminosäuren gemäß SEQ ID NO: 2 oder 4 umfasst; sowie funktionale Äquivalente da-

von, welche Trans-Sialidase-Aktivität besitzen.

Gegenstand der Erfindung sind insbesondere Trans-Sialidasen oder funktionale Äquivalente davon mit Trans-Sialidase-Aktivität, gekennzeichnet durch eine der folgenden

5 Aminosäureteilsequenzen:

TDTVAKYSTDGGRTWKREVIIPNGR (Pos. 1 bis 25 gemäß SEQ ID NO:2)

FRIPSLVEIDGVLIATFDTRYLRASDSSLI (Pos. 1 bis 30 gemäß SEQ ID NO:4).

10

Eine bevorzugte Trans-Sialidase 1 (TS1) ist durch wenigstens eines der folgenden Charakteristika gekennzeichnet:

Nukleotidteilsequenz	SEQ ID NO:1
Aminosäureteilsequenz	SEQ ID NO:2
Temperaturoptimum	30-40°C
pH Optimum	pH 6.5-8.5
Isoelektrischer Punkt	pH 4-5
Molekulargewicht nativ	400-600 kDa
Molekulargewicht im reduzierenden SDS-page	90 kDa

Eine weitere bevorzugte Trans-Sialidase 2 (TS2), ist durch wenigstens eines der folgenden Charakteristika gekennzeichnet:

15

Nukleotidteilsequenz	SEQ ID NO:3
Aminosäureteilsequenz	SEQ ID NO:4
Temperaturoptimum	30-40°C
pH Optimum	pH 6.5-8.5
Isoelektrischer Punkt	pH 5-6

Molekulargewicht nativ	120-180 kDa
Molekulargewicht im reduzierenden SDS-page	90 kDa

Die oben beschriebenen erfindungsgemäßen Polynukleotide und Polypeptide, insbesondere kodierenden Nukleinsäuresequenzen und Aminosäuresequenzen sind aus dem Organismus *Trypanosoma congolense* ableitbar. Sie sind aber auch unter Anwendung synthetischer, insbesondere chemischer, biochemischer, enzymatischer, gentechnologischer und transgener Methoden zugänglich.

Gegenstand der Erfindung sind weiterhin funktionale Äquivalente erfindungsgemäßer Trans-Sialidasen.

Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Expressionskassetten, umfassend in operativer Verknüpfung mit wenigstens einer regulativen Nukleinsäuresequenz eine Nukleinsäuresequenz gemäß obiger Definition. Weiterhin umfasst die Erfindung auch rekombinante Vektoren, enthaltend wenigstens eine dieser Expressionskassetten.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem prokaryotische oder eukaryotische Wirte, transformiert mit wenigstens einem Vektor gemäß obiger Definition.

Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung einer Expressionskassette, eines Vektors oder eines Wirts gemäß obiger Definition zur rekombinanten Herstellung eines Proteins mit Trans-Sialidase-Aktivität.

Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zur enzymatischen Sialisierung eines Akzeptormoleküls, dadurch gekennzeichnet, dass man das Akzeptormolekül mit einem Sialinsäurereste enthaltenden Donor in Gegenwart einer Trans-Sialidase gemäß obiger Definition inkubiert und den sialylierten Akzeptor isoliert.

Derartige Verfahren sind durch wenigsten eine weitere der folgenden Eigenschaften charakterisiert:

a) der Donor ist ausgewählt unter an Oligosaccharide, Polysaccharide, Polysialinsäuren, Glykoproteine und Glykolipide gebundene Sialinsäuren, wie insbesondere Lactoferrine, glykolisierte Molkenproteine und Caseine und Fragmente davon;

b) der Akzeptor ist ausgewählt unter β -Galaktose enthaltenden Polymeren, wie β -Galaktooligosacchariden, Laktitol, Laktobionsäure, Methyl- β -lactosid, Acetylaktosaminen, Galaktopyranosiden, Trans-Galaktooligosacchariden, Polygalaktose und anderen Glykokonjugaten mit endständig gebundener $\beta(1-3)$ oder $\beta(1-4)$ -Galaktose; oder Galaktose.

10 Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung einer erfindungsgemäßen Trans-Sialidase, einer dafür kodierenden Nukleinsäuresequenz oder eines erfindungsgemäß hergestellten Sialisierungsprodukts zur Herstellung eines Medikaments, Nahrungsmittels oder Nahrungsergänzungsmittels oder einer Nahrungsmittelzusatzes zur Prävention oder Behandlung Sialinsäure-gesteuerter parasitärer, bakterieller oder viraler Infektionen; zur Behandlung von Tumorerkrankungen; zur Behandlung von Erkrankungen, welche mit einer Entwicklungsstörung des Gewebes assoziiert sind; zur Behandlung von Erkrankungen des Immunsystems; zur Behandlung von Autoimmunreaktionen; zur Behandlung von Erkrankungen mit gestörter Zellkommunikation; und/oder zur Behandlung von Entzündungen.

20 Insbesondere ist Gegenstand der Erfindung die Verwendung einer erfindungsgemäßen Trans-Sialidase gemäß obiger Definition, zur Entwicklung eines Trypanosomiasis-Impfstoffs oder zur Entwicklung von Enzyminhibitoren zur Behandlung oder Prävention von Trypanosoma-Infektionen.

25 Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung einer Trans-Sialidase, einer dafür kodierenden Nukleinsäuresequenz oder eines erfindungsgemäß hergestellten sialylierten Produkts zur Herstellung eines Medikaments, Nahrungsergänzungsmittels oder Nahrungsmittels zum Schutz körpereigener Zellen oder Gewebe oder Glykoproteine vor enzymatischer Einwirkung.

30

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin die Verwendung einer Trans-Sialidase, einer dafür kodierenden Nukleinsäuresequenz oder eines erfindungsgemäß hergestellten

sialylierten Produkts zur Herstellung eines Medikaments, Nahrungsergänzungsmittels oder Nahrungsmittels zu Beeinflussung der Entwicklung und/oder Morphogenese von Körpergeweben.

- 5 Weiterhin betrifft die Erfindung Effektoren der Trans-Sialidase-Aktivität einer Trans-Sialidase, ausgewählt unter
- a) Polypeptid-Liganden, welche mit einer Trans-Sialidase gemäß obiger Definition wechselwirken;
 - b) niedermolekularen Effektoren, welche die biologische Aktivität einer Trans-Sialidase gemäß obiger Definition modulieren; und
 - 10 c) Antisense-Nukleinsäuresequenzen zu einer Nukleinsäuresequenz gemäß obiger Definition.

- 15 Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung eines solchen Effektors zur Herstellung eines Medikaments, Nahrungsergänzungsmittels oder Nahrungsmittels zur Behandlung oder Prävention von mit Trans-Sialidase-Aktivität assoziierten Erkrankungen.

Gegenstand der Erfindung ist weiterhin ein Verfahren zur Isolierung eines Enzyms mit Trans-Sialidase-Aktivität, wobei man

- 20 a) *Trypanosoma congolense* in einem Medium kultiviert, und
 - b) das gewünschte Produkt aus dem Kulturüberstand durch Ionenaustauschchromatographie mit Hilfe eines Salzgradienten, gegebenenfalls gefolgt von Isoelektrischer Fokussierung, Gelfiltration, Affinitätschromatographie und/oder Proteinfällung, isoliert.
- 25 Schließlich betrifft die Erfindung pharmazeutisches oder gentherapeutisches Mittel, enthaltend in einem pharmazeutisch oder gentherapeutisch verträglichen Träger wenigstens einen Effektor gemäß obiger Definition

30 Detaillierte Beschreibung der Erfindung

i) Bedeutung der Erfindung

Die Bedeutung der vorliegenden Erfindung ergibt sich aus der mit dieser Erfindung nun möglichen Beeinflussung der Sialinsäure-gesteuerten parasitären, bakteriellen und viralen Infektionsmechanismen, der Beeinflussung der Zellkommunikation und des Immunsystems und der Veränderung der Regulations- und Entwicklungsmechnismen menschlicher und tierischer Gewebe sowie von Tumoren. Dies wird durch die gezielte Übertragung von Sialinsäuren auf biologisch relevante Glykostrukturen (Glykane, Glykanderivate und Glykokonjugate) mittels der hierin beschriebenen Trans-Sialidasen erreicht.

Aus der Übertragung der Sialinsäuren auf ausgewählte Trägerstrukturen ergeben sich beispielsweise Produkte zur Veränderung von Entzündungsreaktionen, Veränderung zellulärer Interaktionen im menschlichen und tierischen Körper, Schutz körpereigener Gewebe vor Angriffen des eigenen Immunsystems (Autoimmunreaktionen), „Enttarnung“ von Krebszellen im Körper eines Patienten, damit sie vom körpereigenen Immunsystem wieder bekämpft werden (Krebstherapie und Krebsprävention), Bekämpfung des Eindringens pathogener Bakterien in den menschlichen und tierischen Körper, Prävention und Bekämpfung von viralen Infektionen, Bekämpfung von Infektionen der Magenschleimhaut durch *Helicobacter pylori*, Bekämpfung der durch Bakterien und Viren hervorgerufenen Neugeborenen-Meningitis, Präventive und therapeutische Beeinflussung von Rezeptoren von eukaryontischen und prokaryontischen pathogenen Organismen, Bakterien, Viren und Toxinen zur Vermeidung derer Wirkungsentfaltung im menschlichen und tierischen Körper, Inhibition der Bindung des Cholera-Toxins an menschliche und tierische Schleimhäute des Verdauungstraktes, Entwicklung eines Impfstoffes gegen Trypanosomiasis, Entwicklung von Enzyminhibitoren zur Bekämpfung (Therapie) von *Trypanosoma* Infektionen, Beeinflussung molekularer und zellulärer Erkennungsprozesse im menschlichen und tierischen Körper, Schutz von Glykoproteinen und Zellen vor dem Angriff durch Proteasen und andere Enzyme, unter anderem auch zum Schutz des Abbaus der Moleküle durch Enzyme des menschlichen und tierischen Verdauungstraktes, Beeinflussung der Entwicklung von Körpergeweben und Beeinflussung der Morphogenese von Körpergeweben.

Die erfindungsgemäßen Trans-Sialidasen sind durch folgende DNS- und Aminosäure-Teilsequenzen sowie durch andere DNS-Sequenz-Homologe, z.B. mit einer mehr als 60 prozentigen Übereinstimmung (Identität) zu diesen Teilsequenzen, charakterisiert.

ii) Sequenzangaben zu bevorzugten Trans-Sialidasen

(1) Informationen für die Sequenz des Enzyms TS1:

Merkmale der DNS der Teilsequenz von TS1:

Länge: 1491 Basenpaare

Typ: Nukleinsäure

Strangform: doppelt

Ursprung: *Trypanosoma congolense*

DNS Teilsequenz des Enzyms TS1 (SEQ ID NO: 1):

5'ACCGACACCGTTGCTAAATACAGCACTGACGGTGGGAGAACGTGGAAGAGGGA
GGTTATAATTCCGAATGGTCGTGTGGATGCCCACTACTCCCGCGTCGTTGATCCCA
15 CTGTTGTTGCGAAGGGTAATAACATTTATGTTCTCGTTGGGCGGTACAATGTCAGG
CGGGGCTACTGGCACAATAGGAACAACAAGGCTGGCATAGCCGATTGGGAGCCC
TTCGTGTACAAGGGCACGGTGAACGTGGGCACGAAGGGCAATGCCACTGATGTGT
CGATCAGCTGGGAGAGGACTGCACTGAAGTCGCTGTACAACTTCCCGGTTTCGGG
AAGCCCTGGCACGCAGTTCCTTGGAGGGGCTGGGGGTGGTGTGTAACATCCAA
20 CGGGACGATTGTGCTGCCAGTGCAGGCAAGGAACAAGGCCAACCGTGTTGTGAG
CATGATCCTGTACTCGGCTGACGATGGAAAGTCATGGCACTTTGGGAAGGGTGAG
GCCGGTGTAGGCACGTCCGAGGCTGCCCTCACTGAGTGGGACGGCAAGCTGCTG
ATTAGTGACGATCCGATGGTGGACAGGGCTACCGCATGATATTCGAATCGAGTG
ACCTTGGTGCAGCTGGAAAGAGATGCTCAACAGCATCTCCCGCGTGATTGGCAA
25 CTCTCCGGGTGCGAGTGGTCCTGGCAGCTCGAGTGGCTTCATCACGGTGACAGTG
GAGGGTGTGCCTGTGATGCTGATTACCCACCCGAAGAACCTTAAGGGCTCGTATT
ATCGGGACCGTCTGCAGCTGTGGATGACGGACGGCAATCGTATGTGGCATGTGCG
GGCAGGTCTCTGAGGGGCGACGATAACAGCGCTTACAGCTCCCTGCTGTACACTCC
GGACGGGGTCTGTACTGCTTGCATGAGCAGAACATTGATGAGGTGTACAGCCTC
30 CACCTTGTGCGCCTTGTGGACGAGCTGAAAAGCATTAAATCAACGGCTCTGGTGT
GGAAGGCACAGGACGAGCTTCTCCTGGGCAACTGCCTCCCGGGCGATAAATACG
ATCCCGGGTGTGACGGCATCCCCACCGCTGGGCTTGCCGGGCTGCTGGTAGGAC
CCCTGACGGAGAAGACGTGGCCCGACGCGTATCGGTGCGTGAACGCTGCAACCA

GCGGCGCTGTGAGCACTGCTGAAGGCGTGCGGCTGGACGTGGGTGGCGGTGGC
 CATGTTGTGTGGCCCGTGAGTGAGCAGGGGCAGGACCAGCGGTATTACTTTACCA
 ACAGCGAGTTCACGCTCGCCGTCACGGTGCGGTTTGACGAGATGCCACGGGGGG
 AGCTCCCGTTGCTGGGGTTTGTGAACCGCAAAGGGAAGGTGAAGAAGATACTGAA
 5 GGTGTCGCTGAGCGGGGTGGAGTGGCTCCTGGCATA CGGGAATGAGTACAACAG
 CACAGCCGCTGAGCCGCTGGACGTGAACGAGAGCCACCAGGTGGTGCTAGCGCT
 TCACGACGGGATCGTCTCC 3'

Aminosäureteilsequenz des Enzyms TS1 (SEQ ID NO: 2):

10 TDTVAKYSTDGGRTWKREVIIPNGRVDAHYSRVVDPTVWAKGNNIYVLVGRYNVTRGY
 WHNRNNKAGIADWEPFVYKGTNVNVTGKNATDVSISWERTALKSLYNFPVSGSPGTQ
 FLGGAGGGVVT SNGTIVLPVQARNKANRVVSMILYSADDGKSWHFGKGEAGVGTSEA
 ALTEWDGKLLISARSDGGQGYRMIFESSDLGATWKEMLNSISRVIGNSPGRSGPGSSS
 GFITVTVEGVPVMLITHPKNLKGSYYRDLQLWMTDGNRMWHVGQVSEGDDNSAYS
 15 SLLYTPDGVLYCLHEQNIDEVYSLHLVRLVDELKSIKSTALVWKAQDELLLGNCPLPGDK
 YDPGCDGIPTAGLAGLLVGPLTEKTWPDAYRCVNAATSGAVSTAEGVRLDVGGGGHV
 VWPVSEQGQDQRYFTNSEFTLAVTVRFDEMPRGELPLLGFVNRKGKVKILKVSLS
 GVEWLLAYGNEYNSTAAEPLDVNESHQVVLALHDGIVS

20

(2) Informationen für die Sequenz des Enzyms TS2:

Merkmale der DNS der Teilsequenz von TS2: Länge: 831 Basenpaare

Typ: Nukleinsäure

25

Strangform: doppelt

Ursprung: *Trypanosoma congolense*

DNS Teilsequenz des Enzyms TS2 (SEQ ID NO: 3):

5' TTCCGAATTCCCTCACTTGTTGAGATAGACGGCGTGCTTATCGCGACATTCGATA
 30 CACGTTATCTTCGCGCTTCCGACAGCAGTCTCATAGACACAGCTATGAAATACAGT
 GCCGATCAGGGGAAGACGTGGAAGAACTGAAATCATAATAAAAAATGCTAGACTAAC
 TGATAACTTTTCCCGCGTCGTTGATCCAACGGTTGTTGTTAAGGGTGATAACTTGT
 TTATTTTGTGGGAGGTACAACACCTCATCTGCCCCATGGGTCTGGCAGGAAAC

GGTAAAGACTGGGATGTACTGTTGTACAAGGCCAAGGTGAGGAAGGAATCAGCGG
 GTGGGGTACCATCAGTGAGCTTTACATGGGACGAACCCCTATACCTGAAGCATCT
 GCTCACCTCTGTCCGGTAAAATAGACGGCAGGTCCCTCATACAATACATTGGTGGC
 GTTGGAAATGGTATTGTAACACCGAAAGGTACTATCGTGTTTCCAGTTCAGGTTTT
 5 AAACACCAACAAATCCGTCATGAACATGCTTCTGTATTCAAGTAACGACGGAAAA
 CCTGGGAGTTCAGCAAACTTCCACACCCGCGGGCACAACCTGAGGCCTCCCTTGT
 TTGGTGGGATGGACAACCTACTTCTCACAAGCAGAACAACCTCCGGATGTCGGCAGC
 CGCAAAGTATATTTAACAAGCGACCTCGGAACCTTCATGGAATGAAGCGATCGGAAG
 TATCTCTCGTGTAATTGGTAACTCGCGGTACCGTAACGATCCTGGGGGGTTCAGGT
 10 AGCTCAATTGCCATAACTGTGGAGGGAGTACCGGTGATGCTGATTACCCACCCG3'

Aminosäureteilsequenz des Enzyms TS2 (SEQ ID NO: 4):

FRIPSLVEIDGVLIATFDTRYLRASDSSLIDTAMKYSADQGKTWKTEIIKNARLTDNFSR
 VVDPTVWVKGDNLFI FVGRYNTSSAPWWWQENGKDWDVLLYKAKVRKESAGGVPSV
 15 SFTWDEPLYLKHLLTSVGKIDGRSLIQYIGGVGNGIVTPKGTIVFPVQVLNTNKSVMNM
 LLYSSNDGKTWEFSKTSTPAGTTEASLVWWDGQLLLTSRTTPDVGSRKVYLTSDLGT
 SWNEAIGSISR VIGNSR YRNDPGGSGSSIAITVEGVPVMLITHP

Die Teilsequenzen der Aminosäuren von Enzym TS1 und Enzym TS2 haben eine Ü-
 20 bereinstimmung (Identität) von nur ca. 50%. Die Teilsequenzen charakterisieren daher
 eindeutig zwei verschiedene Stoffe (siehe Bild 1).

iii) Beschreibung der Eigenschaften der neu gefundenen Enzyme TS1 und TS2

25 a) Physikalisch/chemische Eigenschaften der Stoffe

Tabelle 1: Basisdaten der beiden Trans-Sialidasen TS1 und TS2

Eigenschaften	TS1	TS2
Temperaturoptimum	30-40°C	30-40°C
pH Optimum	pH 6.5-8.5	pH 6.5-8.5
Isoelektrischer Punkt	pH 4-5	pH 5-6
Molekulargewicht nativ	400-600 kDa	120-180 kDa

Molekulargewicht im reduzierenden SDS-page	90 kDa	90 kDa
Salzeinfluss	1M KCl und NaCl reduziert die Aktivität beider Enzyme um 50%, Entsalzung stellt Enzymaktivität wieder her	
Einfluss von Metallionen	20 mM Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} : kein Einfluss 5 mM Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} : wenig Einfluss	
Einfluss von putativen Inhibitoren	10 mM <i>N</i> -(4-Nitrophenyl)oxamsäure: wenig Inhibition 10 mM <i>N</i> -acetyl-2,3-didehydr-2-deoxyneuraminsäure: wenig Inhibition.	

b) Biologische Eigenschaften der Stoffe

Die beiden hier beanspruchten Stoffe sind zwei Enzyme, die Sialinsäuren von einem Donormolekül auf ein Akzeptormolekül übertragen.

Als Donoren fungieren bei beiden Enzymen an Glykane, z. B. an Oligosaccharide, Polysaccharide, Polysialinsäuren, Glykoproteine und Glykolipide, gebundene Sialinsäuren. Unter den Glykoproteinen sind insbesondere Lactoferrine (aus Mensch, Kuh, Ziege, Schaf, Pferd, Kamel und anderen Tieren), glykolisierte Molkenproteine (aus Mensch, Kuh, Ziege, Schaf, Pferd, Kamel und anderen Tieren) und Caseine (aus Mensch, Kuh, Ziege, Schaf, Pferd, Kamel und anderen Tieren) sowie andere glykolisierte Proteine humanen, tierischen und pflanzlichen Ursprungs sowie Teilen davon, wie z. B. Teilstücke aus Caseinen (aus Mensch, Kuh, Ziege, Schaf, Pferd, Kamel und anderen Tieren) wie beispielsweise das Glykomakropeptid aus den Caseinen dieser Tiere gute Donoren für Sialinsäuren, die von den Enzymen übertragen werden können. Ganglioside können ebenfalls als Donoren eingesetzt werden.

Beide Trans-Sialidasen haben eine gute Akzeptorspezifität für Galaktooligosaccharide, insbesondere für beta-Galakto-Oligosaccharide, wie z. B. *Vivinal GOS* von der Firma *Borculo Domo Ingredients* (BDI) und *Oligomate 55* von der Firma *Yakult*. Außerdem können Laktitol, Laktobionsäure, Methyl- β -lactosid, Acetylaktosamine, Galaktopyranoside, Trans-Galaktooligosaccharide, Polygalaktosen und andere Glykokonjugate mit endständig gebundener β (1-3) oder β (1-4)-Galaktose als Akzeptoren fungieren. Eine

Methylierung des Galaktoserestes führt zu einer Verminderung der Akzeptorfunktion. Die Methylierung eines Glukoserestes (z. B. bei der Laktose) hat einen geringen Einfluss auf die Akzeptorfunktion. Das Monosaccharid Galaktose dient ebenfalls als Akzeptor, wenn auch mit geringerer Spezifität.

5

Das Enzym TS1 zeigt eine etwa doppelt so effiziente Übertragung der Sialinsäuren auf die entsprechenden Akzeptoren wie das Enzym TS2. Die Substrate können frei, d.h. löslich, oder auch Zellmembran-gebunden sein.

10

Die Übertragung von alpha-2,3-gebundenen endständigen Sialinsäuren auf beta-1,4-gebundene endständige Galaktosereste ist auch von den Trans-Sialidasen von *Trypanosoma cruzi* (Schenkman *et al.*, 1991; Vandekerckhove *et al.*, 1992; Scudder *et al.*, 1993) und *Trypanosoma brucei* (Engstler *et al.*, 1992, 1993, 1995) bekannt. Aufgrund unterschiedlicher DNS- und Aminosäuresequenzen unterscheiden sich TS1 und TS2 jedoch von den bereits bekannten Enzymen. TS1 und TS2 sind damit eindeutig als neue Stoffe (Trans-Sialidasen) charakterisiert. Zur weiteren Abgrenzung siehe den nächsten Absatz.

15

iv) Abgrenzung der Erfindung zu anderen Trans-Sialidasen, Sialidasen und Sialyltransferasen

20

Das erste Mal beschrieben wurde ein Enzym „Trans-Sialidase“ in der amerikanischen Trypanosomenart *Trypanosoma cruzi* (Schenkman *et al.*, 1991). Wenig später konnte das Enzym ebenfalls in den afrikanischen Arten *Trypanosoma brucei gambiense*, *Trypanosoma brucei rhodesiense* und *Trypanosoma brucei brucei* nachgewiesen werden (Engstler *et al.*, 1993, Pontes de Carvalho *et al.*, 1993, Engstler *et al.*, 1995). Weiterhin wurde Trans-Sialidase in *Endotrypanum* Arten (Parasiten, die das Faultier befallen) (Medina-Acosta *et al.*, 1994), in *Corynebacterium diphtheriae* (Mattos-Guaraldi *et al.*, 1998) und im menschlichen Plasma (Tertov *et al.* 2001) detektiert. Bereits lange vor den Nachweis der Trans-Sialidasen waren die sogenannten Sialidasen bekannt. Dies sind Glykohydrolasen, die Sialinsäuren von einem Donormolekül ausschließlich auf Wasser übertragen, die Sialinsäuren also von Oligosacchariden und Glykokonjugaten abhydrolysieren.

30

Weiterhin können bestimmte Enzyme mit Cytidin-Monophosphat (CMP)-aktivierte Sialinsäuren auf andere Zuckerreste, meist Galaktose und *N*-Acetylgalaktosamin, übertragen. Diese Enzyme nennt man Sialyltransferasen (siehe Bild 2).

5

Die hier beanspruchten Trans-Sialidasen übertragen Sialinsäuren nicht ausschließlich von einem Donormolekül auf Wasser, wie dies die reinen Sialidasen tun. Fehlt jedoch ein geeigneter Akzeptor, hydrolysieren die hier beanspruchten Trans-Sialidasen die Sialinsäuren ebenso wie die einfachen Sialidasen. Die hier beanspruchten Trans-Sialidasen benötigen auch keine aktivierten Sialinsäuren für ihre Übertragungsreaktion wie die zuvor erwähnten Sialyltransferasen. Die Trans-Sialidasen haben auch eine breitere Donor- und Akzeptorspezifität als die Sialyltransferasen und sind deshalb besonders vielseitig einsetzbar. Die hier beanspruchten Trans-Sialidasen sind damit für die industrielle Verwertung vorteilhafter als die reinen Sialidasen und Sialyltransferasen.

15

Bisher sind nur die DNS- und Aminosäuresequenzen der Trans-Sialidasen von *Trypanosoma cruzi* und *Trypanosoma brucei brucei* bekannt, sowie die DNS- und Aminosäuresequenz einer reinen Sialidase aus *Trypanosoma rangeli*. Das hier beanspruchte Enzym TS1 hat zu der entsprechenden Aminosäureteilsequenz der Trans-Sialidase aus *Trypanosoma brucei brucei* eine Übereinstimmung (Identität) von unter 60% und zu der entsprechenden Teilsequenz von *Trypanosoma cruzi* eine Übereinstimmung von unter 50%. Das hier beanspruchte Enzym TS2 hat zu der entsprechenden Aminosäureteilsequenz der Trans-Sialidase aus *Trypanosoma brucei brucei* eine Übereinstimmung (Identität) von unter 50% und zu der entsprechenden Teilsequenz von *Trypanosoma cruzi* eine Übereinstimmung von ebenfalls unter 50% (siehe Bild 3). Des Weiteren ist bekannt, dass die Übereinstimmung der Aminosäuren zwischen den Trans-Sialidasen von Trypanosomen und den bekannten Sialidasen und Trans-Sialidasen von Bakterien und Viren nur 20% bis 30% beträgt (Chuenkova et al., 1999, Montagna et al., 2002).

20

25

30

Bei den hier beschriebenen Enzymen handelt es sich somit um neu charakterisierte Stoffe (Enzyme), deren Übereinstimmung (Identität) zu den entsprechenden DNS- und Aminosäuresequenzen anderer bekannter Enzyme ähnlicher Funktion unter 60% beträgt.

v) Weitere Erläuterungen zur vorliegenden Erfindung

a) Polypeptide und funktionale Äquivalente

5

„Polypeptide“ im Sinne der Erfindung umfassen charakteristische Teilfragmente der erfindungsgemäßen Aminosäuresequenzen, ebenso wie Aminosäuresequenzen der erfindungsgemäßen Enzyme und der funktionalen Äquivalente davon.

10

Erfindungsgemäß mit umfasst sind somit ebenfalls „funktionale Äquivalente“ oder „Homologe“ der konkret offenbarten neuen Polypeptide bzw. Enzyme.

15

„Funktionale Äquivalente“ oder Analoga der konkret offenbarten Polypeptide sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung davon verschiedene Polypeptide, welche weiterhin die gewünschte biologische Aktivität gemäß obiger Definition (wie z.B. Substratspezifität) besitzen.

20

Unter „funktionalen Äquivalenten“ versteht man erfindungsgemäß insbesondere Mutanten, welche in wenigstens einer der oben genannten Sequenzpositionen eine andere als die konkret genannte Aminosäure aufweisen aber trotzdem eine der hierin genannten biologische Aktivität besitzen. „Funktionale Äquivalente“ umfassen somit die durch eine oder mehrere Aminosäure-Additionen, -Substituenten, -Deletionen und/oder -Inversionen erhältlichen Mutanten, wobei die genannten Veränderungen in jeglicher Sequenzposition auftreten können, solange sie zu einer Mutante mit dem erfindungsgemäßen Eigenschaftsprofil führen. Funktionale Äquivalenz ist insbesondere auch dann gegeben, wenn die Reaktivitätsmuster zwischen Mutante und unverändertem Polypeptid qualitativ übereinstimmen, d.h. beispielsweise gleiche Substrate mit unterschiedlicher Geschwindigkeit umgesetzt werden.

25

30

„Funktionale Äquivalente“ im obigen Sinne sind auch Präkursoren der beschriebenen Polypeptide sowie funktionale Derivate und Salze der Polypeptide. Unter dem Ausdruck „Salze“ versteht man sowohl Salze von Carboxylgruppen als auch Säureadditionssalze von Aminogruppen der erfindungsgemäßen Proteinmoleküle. Salze von Carboxylgrup-

pen können in an sich bekannter Weise hergestellt werden und umfassen anorganische Salze, wie zum Beispiel Natrium-, Calcium-, Ammonium-, Eisen- und Zinksalze, sowie Salze mit organischen Basen, wie zum Beispiel Aminen, wie Triethanolamin, Arginin, Lysin, Piperidin und dergleichen. Säureadditionssalze, wie zum Beispiel Salze mit Mineralsäuren, wie Salzsäure oder Schwefelsäure und Salze mit organischen Säuren, wie Essigsäure und Oxalsäure sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

„Funktionale Derivate“ erfindungsgemäßer Polypeptide können an funktionellen Aminosäure-Seitengruppen oder an deren N- oder C-terminalen Ende mit Hilfe bekannter Techniken ebenfalls hergestellt werden. Derartige Derivate umfassen beispielsweise aliphatische Ester von Carbonsäuregruppen, Amide von Carbonsäuregruppen, erhältlich durch Umsetzung mit Ammoniak oder mit einem primären oder sekundären Amin; N-Acylderivate freier Aminogruppen, hergestellt durch Umsetzung mit Acylgruppen; oder O-Acylderivate freier Hydroxygruppen, hergestellt durch Umsetzung mit Acylgruppen.

„Funktionale Äquivalente“ umfassen natürlich auch Polypeptide welche aus anderen Organismen zugänglich sind sowie natürlich vorkommende Varianten. Beispielsweise lassen sich durch Sequenzvergleich Bereiche homologer Sequenzregionen festlegen und in Anlehnung an die konkreten Vorgaben der Erfindung äquivalente Enzyme ermitteln.

„Funktionale Äquivalente“ umfassen ebenfalls Fragmente, vorzugsweise einzelne Domänen oder Sequenzmotive, der erfindungsgemäßen Polypeptide, welche z.B. die gewünschte biologische Funktion aufweisen.

„Funktionale Äquivalente“ sind außerdem Fusionsproteine, welche ein der oben genannten Polypeptidsequenzen oder davon abgeleitete funktionale Äquivalente und wenigstens eine weitere, davon funktionell verschiedene, heterologe Sequenz in funktioneller N- oder C-terminaler Verknüpfung (d.h. ohne gegenseitigen wesentliche funktionelle Beeinträchtigung der Fusionsproteinteile) aufweisen. Nichtlimitierende Beispiele für derartige heterologe Sequenzen sind z.B. Signalpeptide, Enzyme, Immunoglobuline, Oberflächenantigene, Rezeptoren oder Rezeptorliganden.

- „Funktionale Äquivalente“ erfindungsgemäßer Trans-Sialidasen sind insbesondere Enzyme, deren Aminosäuresequenzen oder -teilsequenzen zur korrespondierenden Aminosäuresequenz oder -teilsequenz gemäß SEQ ID NO: 2 oder 4 eine Sequenzidentität (Sequenzhomologie) von wenigsten 60 % insbesondere wenigstens 65 % oder wenigstens 70 %, wie z.B. 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% oder 99%, berechnet nach dem Algorithmus von Pearson und Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85(8), 1988, 2444-2448, aufweisen.
- 10 Im Falle einer möglichen Proteinglykosylierung umfassen erfindungsgemäße Äquivalente Proteine des oben bezeichneten Typs in deglykosylierter bzw. glykosylierter Form sowie durch Veränderung des Glykosylierungsmusters erhältliche abgewandelte Formen.
- 15 Homologe der erfindungsgemäßen Proteine oder Polypeptide können durch Mutagenese erzeugt werden, z.B. durch Punktmutation, Verlängerung oder Verkürzung des Proteins. Der Begriff "Homolog", wie er hier verwendet wird, betrifft auch eine variante Form des Proteins, die als Agonist oder Antagonist der Protein-Aktivität wirkt.
- 20 Homologe der erfindungsgemäßen Proteine können durch Screening kombinatorischer Banken von Mutanten, wie z.B. Verkürzungsmutanten, identifiziert werden. Beispielsweise kann eine variierte Bank von Protein-Varianten durch kombinatorische Mutagenese auf Nukleinsäureebene erzeugt werden, wie z.B. durch enzymatisches Ligieren eines Gemisches synthetischer Oligonukleotide. Es gibt eine Vielzahl von Verfahren,
- 25 die zur Herstellung von Banken potentieller Homologer aus einer degenerierten Oligonukleotidsequenz verwendet werden können. Die chemische Synthese einer degenerierten Gensequenz kann in einem DNA-Syntheseautomaten durchgeführt werden, und das synthetische Gen kann dann in einen geeigneten Expressionsvektor ligiert werden. Die Verwendung eines degenerierten Gensatzes ermöglicht die Bereitstellung sämtlicher
- 30 Sequenzen in einem Gemisch, die den gewünschten Satz an potentiellen Proteinsequenzen codieren. Verfahren zur Synthese degenerierter Oligonukleotide sind dem Fachmann bekannt (Z.B. Narang, S.A. (1983) Tetrahedron 39:3; Itakura et al. (1984)

Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura et al., (1984) Science 198:1056; Ike et al. (1983) Nucleic Acids Res. 11:477).

b) Polynukleotide

5

„Polynukleotide“ im Sinne der vorliegenden Erfindung umfassen charakteristische Teilfragmente der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen die für Aminosäureteilsequenzen erfindungsgemäßer Enzyme kodieren, ebenso wie Nukleinsäuresequenzen die für Enzyme und deren funktionale Äquivalente kodieren. Polynukleotide umfassen vorzugsweise mehr als etwa 20 insbesondere mehr als etwa 30, wie z.B. mehr als etwa 45 oder mehr als etwa 60 Nukleinsäurereste.

10

„Oligonukleotide“ umfassen insbesondere eine Sequenz von weniger als etwa 60, vorzugsweise weniger als etwa 45, insbesondere weniger als etwa 30 oder weniger als etwa 20 Nukleinsäurereste.

15

Alle hierin erwähnten „Nukleinsäuresequenzen“ sind in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen, wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoramiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seiten 896–897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mit Hilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

20

25

Gegenstand der Erfindung sind auch Nukleinsäuresequenzen (einzeln- und doppelsträngige DNA- und RNA-Sequenzen, wie z.B. cDNA und mRNA), kodierend für eines der obigen Polypeptide und deren funktionalen Äquivalenten, welche z.B. auch unter Verwendung künstlicher Nukleotidanaloga zugänglich sind.

30

Die Erfindung betrifft sowohl isolierte Nukleinsäuremoleküle, welche für erfindungsgemäße Polypeptide bzw. Proteine oder biologisch aktive Abschnitte davon kodieren, sowie Nukleinsäurefragmente, die z.B. zur Verwendung als Hybridisierungs-sonden oder Primer zur Identifizierung oder Amplifizierung von erfindungsgemäßer kodierenden Nukleinsäuren verwendet werden können.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle können zudem untranslatierte Sequenzen vom 3'- und/oder 5'-Ende des kodierenden Genbereichs enthalten

10 Ein "isoliertes" Nukleinsäuremolekül wird von anderen Nukleinsäuremolekülen abgetrennt, die in der natürlichen Quelle der Nukleinsäure zugegen sind und kann überdies im wesentlichen frei von anderem zellulären Material oder Kulturmedium sein, wenn es durch rekombinante Techniken hergestellt wird, oder frei von chemischen Vorstufen oder anderen Chemikalien sein, wenn es chemisch synthetisiert wird.

15

Ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül kann mittels molekularbiologischer Standardtechniken und der erfindungsgemäß bereitgestellten Sequenzinformation isoliert werden. Beispielsweise kann cDNA aus einer geeigneten cDNA-Bank isoliert werden, indem eine der konkret offenbaren vollständigen Sequenzen oder ein Abschnitt davon
20 als Hybridisierungs-sonde und Standard-Hybridisierungstechniken (wie z.B. beschrieben in Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) verwendet werden. Überdies läßt sich ein Nukleinsäuremolekül, umfassend eine der offenbaren Sequenzen oder ein Abschnitt davon, durch Polymerasekettenreaktion isolieren, wobei die Oligonukleotidprimer, die auf der Basis dieser
25 Sequenz erstellt wurden, verwendet werden. Die so amplifizierte Nukleinsäure kann in einen geeigneten Vektor kloniert werden und durch DNA-Sequenzanalyse charakterisiert werden. Die erfindungsgemäßen Oligonukleotide, können ferner durch Standard-Syntheseverfahren, z.B. mit einem automatischen DNA-Synthesegerät, hergestellt werden.
30

Die Erfindung umfasst weiterhin die zu den konkret beschriebenen Nukleotidsequenzen „komplementären“ Nukleinsäuremoleküle oder einen Abschnitt davon.

Die erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen ermöglichen die Erzeugung von Sonden und Primern, die zur Identifizierung und/oder Klonierung von homologen Sequenzen in anderen Zelltypen und Organismen verwendbar sind. Solche Sonden bzw. Primer umfassen gewöhnlich einen Nukleotidsequenzbereich, der unter stringenten Bedingungen an mindestens etwa 12, vorzugsweise mindestens etwa 25, wie z.B. etwa 40, 50 oder 75 aufeinanderfolgende Nukleotide eines Sense-Stranges einer erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz oder eines entsprechenden Antisense-Stranges hybridisiert.

Weitere erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenzen sind abgeleitet von SEQ ID NO: 1 und 3 und unterscheiden sich davon durch Addition, Substitution, Insertion oder Deletion einzelner oder mehrerer Nukleotide, kodieren aber weiterhin für Polypeptide mit dem gewünschten Eigenschaftsprofil.

Erfindungsgemäß umfasst sind auch solche Nukleinsäuresequenzen, die sogenannte stumme Mutationen umfassen oder entsprechend der Codon-Nutzung eines speziellen Ursprungs- oder Wirtsorganismus, im Vergleich zu einer konkret genannten Sequenz verändert sind, ebenso wie natürlich vorkommende Varianten, wie z.B. Spleißvarianten oder Allelvarianten, davon. Gegenstand sind ebenso durch konservative Nukleotidsubstitutionen (d.h. die betreffende Aminosäure wird durch eine Aminosäure gleicher Ladung, Größe, Polarität und/oder Löslichkeit ersetzt) erhältliche Sequenzen.

Gegenstand der Erfindung sind auch die durch Sequenzpolymorphismen von den konkret offenbarten Nukleinsäuren abgeleiteten Moleküle. Diese genetischen Polymorphismen können zwischen Individuen innerhalb einer Population aufgrund der natürlichen Variation existieren. Diese natürlichen Variationen bewirken üblicherweise eine Varianz von 1 bis 5 % in der Nukleotidsequenz eines Gens.

Weiterhin umfasst die Erfindung auch Nukleinsäuresequenzen, welchen mit oben genannten kodierenden Sequenzen hybridisieren oder dazu komplementär sind. Diese Polynukleotide lassen sich bei Durchmusterung von genomischen oder cDNA-Banken auffinden und gegebenenfalls daraus mit geeigneten Primern mittels PCR vermehren und anschließend beispielsweise mit geeigneten Sonden isolieren. Eine weitere Mög-

lichkeit bietet die Transformation geeigneter Mikroorganismen mit erfindungsgemäßen Polynukleotiden oder Vektoren, die Vermehrung der Mikroorganismen und damit der Polynukleotide und deren anschließende Isolierung. Darüber hinaus können erfindungsgemäße Polynukleotide auch auf chemischem Wege synthetisiert werden.

5

10

Unter der Eigenschaft, an Polynukleotide „hybridisieren“ zu können, versteht man die Fähigkeit eines Poly- oder Oligonukleotids unter stringenten Bedingungen an eine nahezu komplementäre Sequenz zu binden, während unter diesen Bedingungen unspezifische Bindungen zwischen nicht-komplementären Partnern unterbleiben. Dazu sollten die Sequenzen zu 70-100%, vorzugsweise zu 90-100%, komplementär sein. Die Eigenschaft komplementärer Sequenzen, spezifisch aneinander binden zu können, macht man sich beispielsweise in der Northern- oder Southern-Blot-Technik oder bei der Primerbindung in PCR oder RT-PCR zunutze. Üblicherweise werden dazu Oligonukleotide ab einer Länge von 30 Basenpaaren eingesetzt.

15

20

25

30

Unter "stringenten" Bedingungen versteht man, wenn beispielsweise nach dem Southern bzw. Northern Blot die DNA bzw. RNA Fragmente auf den Membranen mit einer Sonde unter spezifischen Bedingungen, das heißt, bei einer Temperatur von 60 - 70 °C, (38-42°C bei 50 % Hybridisierungslösungen die 50 % Formamid enthalten) hybridisiert. Weiterhin sind die Bedingungen dann spezifisch bzw. stringent, wenn die im Anschluss an die Hybridisierung durchgeführten Waschschriffe zur Elution unspezifisch hybridisierter DNA bzw. RNA-Sonden ebenfalls spezifisch durchgeführt werden. Bei spezifischen Waschschriffen handelt es sich üblicherweise um das zweimalige Waschen bei 20-25 °C für 5-10min. mit 2 x SSC-Puffer, der 0,1% SDS (Natriumdodecylsulfat) enthält und anschließendem zweimaligen Waschen mit Puffer niedrigerer Ionenstärke (z.B. 0,1 x SSC mit 0,1% SDS) bei höherer Temperatur (z.B. 64 °C). [20x SSC: 3M NaCl, 0,3M Na-Citrat, pH 7,0]. Dabei bleiben nur in hohem Maße komplementäre Nukleinsäuren aneinander gebunden. Die Einstellung stringenter Bedingungen ist dem Fachmann bekannt und ist z.B. in Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. beschrieben.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft "Antisense"-Nukleinsäuren. Diese umfassen eine Nukleotidsequenz, die zu einer kodierenden "Sense"-Nukleinsäure, komplementär

ist. Die Antisense-Nukleinsäure kann zum gesamten kodierenden Strang oder nur zu einem Abschnitt davon komplementär sein. Bei einer weiteren Ausführungsform ist das Antisense-Nukleinsäuremolekül antisense zu einem nicht-kodierenden Bereich des kodierenden Stranges einer Nukleotidsequenz. Der Begriff "nicht-kodierender Bereich" betrifft die als 5'- und 3'-untranslatierte Bereiche bezeichneten Sequenzabschnitte.

Ein Antisense-Oligonukleotid kann z.B. etwa 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 oder 50 Nukleotide lang sein. Eine erfindungsgemäße Antisense-Nukleinsäure kann durch chemische Synthese und enzymatische Ligationsreaktionen mittels im Fachgebiet bekannter Verfahren konstruiert werden. Eine Antisense-Nukleinsäure kann chemisch synthetisiert werden, wobei natürlich vorkommende Nukleotide oder verschieden modifizierte Nukleotide verwendet werden, die so gestaltet sind, daß sie die biologische Stabilität der Moleküle erhöhen, oder die physikalische Stabilität des Duplexes erhöhen, der zwischen der Antisense- und Sense-Nukleinsäure entstanden ist. Beispielsweise können Phosphorthioat-Derivate und acridinsubstituierte Nukleotide verwendet werden. Beispiele modifizierter Nukleotide, die zur Erzeugung der Antisense-Nukleinsäure verwendet werden können, sind z.B. 5-Fluoruracil, 5-Bromuracil, 5-Chloruracil, 5-Ioduracil, Hypoxanthin, Xanthin, 4-Acetylcytosin, und dergleichen.

Die erfindungsgemäßen Antisense-Nukleinsäuremoleküle werden üblicherweise an eine Zelle verabreicht oder in situ erzeugt, so daß sie mit der zellulären mRNA und/oder einer kodierenden DNA hybridisieren oder daran binden, so daß die Expression des Proteins, z.B. durch Hemmung der Transkription und/oder Translation, gehemmt wird.

Die Begriffe "exprimieren" bzw. "Verstärkung" oder „Überexpression“ beschreiben im Kontext der Erfindung die Produktion bzw. Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden. Dazu kann man beispielsweise ein Gen in einen Organismus einbringen, ein vorhandenes Gen durch ein anderes Gen ersetzen, die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöhen, einen starken Promotor verwenden oder ein Gen verwenden, das für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und man kann gegebenenfalls diese Maßnahmen kombinieren.

Die Begriffe „abschwächen“ und „verringern“ beschreiben im Kontext der Erfindung die Abschwächung oder Verringerung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden. Dazu kann man beispielsweise ein Gen in einem Organismus deletieren, ein vorhandenes Gen durch ein anderes Gen ersetzen, die Kopienzahl eines Transkriptes des Gens bzw. der Gene erniedrigen, einen schwachen Promotor verwenden oder ein Gen verwenden, das für ein entsprechendes Enzym mit einer niedrigeren Aktivität kodiert und man kann gegebenenfalls diese Maßnahmen kombinieren.

10 c) Expressionskonstrukte und Vektoren:

Gegenstand der Erfindung sind außerdem Expressionskonstrukte, enthaltend unter der genetischen Kontrolle regulativer Nukleinsäuresequenzen eine für ein erfindungsgemäßes Polypeptid kodierende Nukleinsäuresequenz; sowie Vektoren, umfassend wenigstens eines dieser Expressionskonstrukte. Vorzugsweise umfassen solche erfindungsgemäßen Konstrukte 5'-stromaufwärts von der jeweiligen kodierenden Sequenz einen Promotor und 3'-stromabwärts eine Terminatorsequenz sowie gegebenenfalls weitere übliche regulative Elemente, und zwar jeweils operativ verknüpft mit der kodierenden Sequenz.

20 Unter einer „operativen Verknüpfung“ versteht man die sequentielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und gegebenenfalls weiterer regulativer Elemente derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Beispiele für operativ verknüpfbare Sequenzen sind Targeting-Sequenzen sowie Enhancer, Polyadenylierungssignale und dergleichen. Weitere regulative Elemente umfassen selektierbare Marker, Amplifikationssignale, Replikationsursprünge und dergleichen. Geeignete regulatorische Sequenzen sind z.B. beschrieben in Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990).

30 Zusätzlich zu den artifiziellen Regulationssequenzen kann die natürliche Regulationssequenz vor dem eigentlichen Strukturgen noch vorhanden sein. Durch genetische Veränderung kann diese natürliche Regulation gegebenenfalls ausgeschaltet und die

Expression der Gene erhöht oder erniedrigt werden. Das Genkonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es werden keine zusätzlichen Regulationssignale vor das Strukturgen insertiert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wird nicht entfernt. Statt dessen wird die natürliche Regulationssequenz so mutiert, dass keine Regulation mehr erfolgt und die Genexpression gesteigert oder verringert wird. Die Nukleinsäuresequenzen können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.

Beispiele für brauchbare Promotoren sind: *cos*-, *tac*-, *trp*-, *tet*-, *trp-tet*-, *lpp*-, *lac*-, *lpp-lac*-, *lacIq*-, *T7*-, *T5*-, *T3*-, *gal*-, *trc*-, *ara*-, *SP6*-, *lambda-PR*- oder im *lambda-PL*-Promotor, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien Anwendung finden; sowie die gram-positiven Promotoren *amy* und *SPO2*, die Hefepromotoren *ADC1*, *MFalpha*, *AC*, *P-60*, *CYC1*, *GAPDH* oder die Pflanzenpromotoren *CaMV/35S*, *SSU*, *OCS*, *lib4*, *usp*, *STLS1*, *B33*, *not* oder der Ubiquitin- oder Phaseolin-Promotor. Besonders bevorzugt ist die Verwendung induzierbarer Promotoren, wie z.B. licht- und insbesondere temperaturinduzierbarer Promotoren, wie der *P_lP_r*-Promotor. Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen verwendet werden. Darüber hinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.

Die genannten regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Nukleinsäuresequenzen und der Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, dass das Gen erst nach Induktion exprimiert oder überexprimiert wird, oder dass es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.

Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die Expression positiv beeinflussen und dadurch erhöhen oder erniedrigen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten kodierenden Nukleotidsequenz sowie einem Terminator-

oder Polyadenylierungssignal. Dazu verwendet man gängige Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience (1987) beschrieben sind.

Das rekombinante Nukleinsäurekonstrukt bzw. Genkonstrukt wird zur Expression in einem geeigneten Wirtsorganismus vorteilhafterweise in einen wirtsspezifischen Vektor insertiert, der eine optimale Expression der Gene im Wirt ermöglicht.

"Vektoren" sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus "Cloning Vectors" (Pouwels P. H. et al., Hrsg, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985) entnommen werden. Unter Vektoren sind außer Plasmiden auch alle anderen dem Fachmann bekannten Vektoren, wie beispielsweise Phagen, Viren, wie SV40, CMV, Baculovirus und Adenovirus, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Cosmide, und lineare oder zirkuläre DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert werden.

Als Beispiele für geeignete Expressionsvektoren können genannt werden:

Übliche Fusionsexpressionsvektoren, wie pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B. und Johnson, K.S. (1988) *Gene* 67:31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) und pRIT 5 (Pharmacia, Piscataway, NJ), bei denen Glutathion-S-Transferase (GST), Maltose E-bindendes Protein bzw. Protein A an das rekombinante Zielprotein fusioniert wird.

Nicht-Fusionsprotein-Expressionsvektoren wie pTrc (Amann et al., (1988) *Gene* 69:301-315) und pET 11d (Studier et al. *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, Kalifornien (1990) 60-89).

Hefe-Expressionsvektor zur Expression in der Hefe *S. cerevisiae*, wie pYepSec1 (Baldari et al., (1987) *Embo J.* 6:229-234), pMFa (Kurjan und Herskowitz (1982) *Cell* 30:933-943), pJRY88 (Schultz et al. (1987) *Gene* 54:113-123) sowie pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Vektoren und Verfahren zur Konstruktion von Vektoren, die sich zur Verwendung in anderen Pilzen, wie filamentösen Pilzen, eignen, umfassen diejenigen, die eingehend beschrieben sind in: van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, in: *Applied Molecular Genetics of Fungi*, J.F. Peberdy et al., Hrsg., S. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge.

Baculovirus-Vektoren, die zur Expression von Proteinen in gezüchteten Insektenzellen (bspw. Sf9-Zellen) verfügbar sind, umfassen die pAc-Reihe (Smith et al., (1983) *Mol. Cell Biol.* 3:2156-2165) und die pVL-Reihe (Lucklow und Summers (1989) *Virology* 170:31-39).

Pflanzen-Expressionsvektoren, wie solche, die eingehend beschrieben sind in: Becker, D., Kemper, E., Schell, J. und Masterson, R. (1992) "New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border", *Plant Mol. Biol.* 20:1195-1197; und Bevan, M.W. (1984) "Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation", *Nucl. Acids Res.* 12:8711-8721.

Säugetier-Expressionsvektoren, wie pCDM8 (Seed, B. (1987) *Nature* 329:840) und pMT2PC (Kaufman et al. (1987) *EMBO J.* 6:187-195).

Weitere geeignete Expressionssysteme für prokaryontische und eukaryotische Zellen sind in Kapitel 16 und 17 von Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T., *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 beschrieben.

d) Rekombinante Mikroorganismen:

Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Vektoren sind rekombinante Mikroorganismen herstellbar, welche beispielsweise mit wenigstens einem erfindungsgemäßen Vektor trans-

formiert sind und zur Produktion der erfindungsgemäßen Polypeptide eingesetzt werden können. Vorteilhafterweise werden die oben beschriebenen erfindungsgemäßen rekombinanten Konstrukte in ein geeignetes Wirtssystem eingebracht und exprimiert. Dabei werden vorzugsweise dem Fachmann bekannte geläufige Klonierungs- und Transfektionsmethoden, wie beispielsweise Co-Präzipitation, Protoplastenfusion, Elektroporation, retrovirale Transfektion und dergleichen, verwendet, um die genannten Nukleinsäuren im jeweiligen Expressionssystem zur Expression zu bringen. Geeignete Systeme werden beispielsweise in Current Protocols in Molecular Biology, F. Ausubel et al., Hrsg., Wiley Interscience, New York 1997, oder Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 beschrieben.

Erfindungsgemäß sind auch homolog rekombinierte Mikroorganismen herstellbar. Dazu wird ein Vektor hergestellt, der zumindest einen Abschnitt eines erfindungsgemäßen Gens oder einer kodierenden Sequenz enthält, worin gegebenenfalls wenigstens eine Aminosäure-Deletion, -Addition oder -Substitution eingebracht worden ist, um die erfindungsgemäße Sequenz zu verändern, z.B. funktionell zu disruptieren ("Knockout"-Vektor). Die eingebrachte Sequenz kann z.B. auch ein Homologes aus einem verwandten Mikroorganismus sein oder aus einer Säugetier-, Hefe- oder Insektenquelle abgeleitet sein. Der zur homologen Rekombination verwendete Vektor kann alternativ derart ausgestaltet sein, daß das endogene Gen bei homologer Rekombination mutiert oder anderweitig verändert ist, jedoch noch das funktionelle Protein codiert (z.B. kann der stromaufwärts gelegene regulatorische Bereich derart verändert sein, daß dadurch die Expression des endogenen Proteins verändert wird). Der veränderte Abschnitt des erfindungsgemäßen Gens ist im homologen Rekombinationsvektor. Die Konstruktion geeigneter Vektoren zur homologen Rekombination ist z.B. beschrieben in Thomas, K.R. und Capecchi, M.R. (1987) Cell 51:503.

Als Wirtsorganismen sind prinzipiell alle Organismen geeignet, die eine Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, ihrer Allelvarianten, ihrer funktionellen Äquivalente oder Derivate ermöglichen. Unter Wirtsorganismen sind beispielsweise Bakterien, Pilze, Hefen, pflanzliche oder tierische Zellen zu verstehen. Bevorzugte Organismen sind Bakterien, wie solche der Gattungen Escherichia, wie z. B. Escherichia coli, Streptomy-

ces, Bacillus oder Pseudomonas, eukaryotische Mikroorganismen, wie Saccharomyces cerevisiae, Aspergillus, höhere eukaryotische Zellen aus Tieren oder Pflanzen, beispielsweise Sf9 oder CHO-Zellen.

5 Die Selektion erfolgreich transformierter Organismen kann durch Markergene erfolgen, die ebenfalls im Vektor oder in der Expressionskassette enthalten sind. Beispiele für solche Markergene sind Gene für Antibiotikaresistenz und für Enzyme, die eine farbgebende Reaktion katalysieren, die ein Anfärben der transformierten Zelle bewirkt. Diese können dann mittels automatischer Zellsortierung selektiert werden. Erfolgreich mit einem Vektor transformierte Mikroorganismen, die ein entsprechendes Antibiotikaresistenzgen (z.B. G418 oder Hygromycin) tragen, lassen sich durch entsprechende Antibiotika-enthaltende Medien oder Nährböden selektieren. Markerproteine, die an der Zelloberfläche präsentiert werden, können zur Selektion mittels Affinitätschromatographie genutzt werden.

15

Die Kombination aus den Wirtsorganismen und den zu den Organismen passenden Vektoren, wie Plasmide, Viren oder Phagen, wie beispielsweise Plasmide mit dem RNA-Polymerase/Promoter-System, die Phagen 8 oder 7 oder andere temperente Phagen oder Transposons und/oder weiteren vorteilhaften regulatorischen Sequenzen bildet ein Expressionssystem. Beispielsweise ist unter dem Begriff "Expressionssystem" die Kombination aus Säugetierzellen, wie CHO-Zellen, und Vektoren, wie pcDNA3neo-Vektor, die für Säugetierzellen geeignet sind, zu verstehen.

20

25 Gewünschtenfalls kann das Genprodukt auch in transgenen Organismen, wie transgenen Tieren, insbesondere Mäusen, Schafen oder transgenen Pflanzen zur Expression, gebracht werden.

e) Rekombinante Herstellung der Polypeptide:

30

Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Verfahren zur rekombinanten Herstellung einer erfindungsgemäßen Polypeptide oder funktioneller, biologisch aktiver Fragmente davon, wobei man einen Polypeptide-produzierenden Mikroorganismus kultiviert, gegebenenfalls die Expression der Polypeptide induziert und diese aus der Kultur isoliert.

Die Polypeptide können so auch in großtechnischem Maßstab produziert werden, falls dies erwünscht ist.

Der rekombinante Mikroorganismus kann nach bekannten Verfahren kultiviert und fermentiert werden. Bakterien können beispielsweise in TB- oder LB-Medium und bei einer Temperatur von 20 bis 40°C und einem pH-Wert von 6 bis 9 vermehrt werden. Im Einzelnen werden geeignete Kultivierungsbedingungen beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch and J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) beschrieben.

Die Zellen werden dann, falls die Polypeptide nicht in das Kulturmedium sezerniert werden, aufgeschlossen und das Produkt nach bekannten Proteinisolierungsverfahren aus dem Lysat gewonnen. Die Zellen können wahlweise durch hochfrequenten Ultraschall, durch hohen Druck, wie z.B. in einer French-Druckzelle, durch Osmolyse, durch Einwirkung von Detergenzien, lytischen Enzymen oder organischen Lösungsmitteln, durch Homogenisatoren oder durch Kombination mehrerer der aufgeführten Verfahren aufgeschlossen werden.

Eine Aufreinigung der Polypeptide kann mit bekannten, chromatographischen Verfahren erzielt werden, wie Molekularsieb-Chromatographie (Gelfiltration), wie Q-Sepharose-Chromatographie, Ionenaustausch-Chromatographie und hydrophobe Chromatographie, sowie mit anderen üblichen Verfahren wie Ultrafiltration, Kristallisation, Aussalzen, Dialyse und nativer Gelelektrophorese. Geeignete Verfahren werden beispielsweise in Cooper, F. G., Biochemische Arbeitsmethoden, Verlag Walter de Gruyter, Berlin, New York oder in Scopes, R., Protein Purification, Springer Verlag, New York, Heidelberg, Berlin beschrieben. Analoges gilt für nicht-rekominant hergestellte Polypeptide.

Besonders vorteilhaft ist es, zur Isolierung des rekombinanten Proteins Vektorsysteme oder Oligonukleotide zu verwenden, die die cDNA um bestimmte Nukleotidsequenzen verlängern und damit für veränderte Polypeptide oder Fusionsproteine kodieren; die z.B. einer einfacheren Reinigung dienen. Derartige geeignete Modifikationen sind beispielsweise als Anker fungierende sogenannte "Tags", wie z.B. die als Hexa-Histidin-

Anker bekannte Modifikation oder Epitope, die als Antigene von Antikörpern erkannt werden können (beschrieben zum Beispiel in Harlow, E. and Lane, D., 1988, Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor (N.Y.) Press). Diese Anker können zur Anheftung der Proteine an einen festen Träger, wie z.B. einer Polymermatrix, dienen, die beispielsweise in einer Chromatographiesäule eingefüllt sein kann, oder an einer Mikrotiterplatte oder an einem sonstigen Träger verwendet werden kann.

Gleichzeitig können diese Anker auch zur Erkennung der Proteine verwendet werden. Zur Erkennung der Proteine können außerdem übliche Marker, wie Fluoreszenzfarbstoffe, Enzymmarker, die nach Reaktion mit einem Substrat ein detektierbares Reaktionsprodukt bilden, oder radioaktive Marker, allein oder in Kombination mit den Ankern zur Derivatisierung der Proteine verwendet werden.

f) Reinigung des gewünschten Sialisierungsproduktes aus der Kultur

Die Gewinnung des gewünschten Produktes aus dem Mikroorganismus oder aus dem Kulturüberstand kann durch verschiedene, im Fachgebiet bekannte Verfahren erfolgen. Wird das gewünschte Produkt von den Zellen nicht sezerniert, können die Zellen aus der Kultur durch langsame Zentrifugation geerntet werden, die Zellen können durch Standard-Techniken, wie mechanische Kraft oder Ultraschallbehandlung, lysiert werden. Die Zelltrümmer werden durch Zentrifugation entfernt, und die Überstandsfraction, die die löslichen Proteine enthält, wird zur weiteren Reinigung der gewünschten Verbindung erhalten. Wird das Produkt von den Zellen sezerniert, werden die Zellen durch langsame Zentrifugation aus der Kultur entfernt, und die Überstandsfraction wird zur weiteren Reinigung behalten.

Die Überstandsfraction aus beiden Reinigungsverfahren kann einer Chromatographie mit einem geeigneten Harz unterworfen werden, wobei das gewünschte Molekül mit höherer Selektivität als die Verunreinigungen entweder auf dem Chromatographieharz zurückgehalten wird oder dieses passiert. Diese Chromatographieschritte können nötigenfalls wiederholt werden, wobei die gleichen oder andere Chromatographieharze verwendet werden. Der Fachmann ist in der Auswahl der geeigneten Chromatographieharze und ihrer wirksamsten Anwendung für ein bestimmtes zu reinigendes Molekül

bewandert. Das gereinigte Produkt kann durch Filtration oder Ultrafiltration konzentriert und bei einer Temperatur aufbewahrt werden, bei der die Stabilität des Produktes maximal ist.

- 5 Im Stand der Technik sind viele Reinigungsverfahren bekannt. Diese Reinigungstechniken sind z.B. beschrieben in Bailey, J.E. & Ollis, D.F. Biochemical Engineering Fundamentals, McGraw-Hill: New York (1986).

- 10 Die Identität und Reinheit der isolierten Verbindungen kann durch Techniken des Standes der Technik bestimmt werden. Diese umfassen Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC), spektroskopische Verfahren, Färbeverfahren, Dünnschichtchromatographie, NIRS, Enzymtest oder mikrobiologische Tests. Diese Analyseverfahren sind z.B. zusammengefaßt in: Patek et al. (1994) Appl. Environ. Microbiol. 60:133-140; Malakhova et al. (1996) Biotekhnologiya 11 27-32; und Schmidt et al. (1998) Bioprocess Engineer. 19:67-70. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (1996) Bd. A27, VCH: Weinheim, S. 89-90, S. 521-540, S. 540-547, S. 559-566, 15 575-581 und S. 581-587; Michal, G (1999) Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, John Wiley and Sons; Fallon, A. et al. (1987) Applications of HPLC in Biochemistry in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Bd. 17.

20 Folgende nichtlimitierende Beispiele beschreiben spezielle Ausführungsformen der Erfindung.

- 25 **Beispiele der Herstellung, Reinigung und Verwendung der hier beanspruchten Trans-Sialidasen**

Allgemeines:

- 30 Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Klonierungsschritte wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von

Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) a.a.O. beschrieben durchgeführt.

Beispiel 1: Isolation der Enzyme aus Kulturen von *Trypanosoma congolense*

5

Die prozyklischen Formen von *Trypanosoma congolense* (hinterlegt beim Schweizer Tropeninstitut Basel (STIB) als Stamm Nr. 249) können bei 27°C ohne CO₂ in SM/SDM 79 Medium, welches 10% fötales Kälberserum und Hemin enthält, angezüchtet werden. Nach drei bis vier Tagen ist die Zellzahl von 1×10^6 auf ca. 7×10^6 /ml angewachsen und der Kulturüberstand wird durch Zentrifugation abgetrennt, filtriert und durch Ultrafiltration konzentriert. In dem so gewonnenen Kulturüberstand können 84% der Enzymaktivität festgestellt werden, während noch 16% der Enzymaktivität gebunden an das Zellpellet detektiert werden können. Die konzentrierten Kulturüberstände werden direkt als Enzymkonzentrat für die Trans-Sialidase Reaktionen eingesetzt. Die gewünschten sialisierten Moleküle werden nach der Reaktion aus dem Kulturüberstand isoliert.

15

Beispiel 2: Reinigung der Enzyme

20

Zur Isolierung reiner Enzyme wird der konzentrierte Kulturüberstand auf eine Ionenaustauschssäule (Q Sepharose) gegeben. Die Säule wird nach dem Waschen mit einem Salzgradienten eluiert. TS2 eluiert mit einer Salzkonzentration bis 0,2M, TS1 mit einem Salzgradienten ab 0,2M. Nach der Elution werden die beiden Enzyme getrennt mittels Isoelektrischer Fokussierung, Gelfiltration (Sephades G150 SF), Affinitätschromatographie oder Proteinfällung bis zur apparenten Homogenität aufgereinigt.

25

Beispiel 3: Bestimmung der Enzymaktivität

30

Zur Bestimmung der Transferaktivität der Trans-Sialidase werden 25µl Enzymlösung in 50 mM BisTris Puffer, pH7,0, zusammen mit 1 mM Neu5Ac- α (2-3)lactose als Donor und 0,5 mM 4-Methylumbelliferyl-galactosid als Akzeptor in einem Endvolumen von 50µl bei 37°C für 2h inkubiert. Die Inkubation wird durch Zugabe von 1 ml eiskaltem Wasser abgestoppt. Anschliessend wird der Reaktionsansatz auf vorher mit 0,3 ml Q Sepharose FF (Acetatform) gefüllte und mit Wasser preequilibrierte Säulen gegeben. Nach dem

Auswaschen des Akzeptors mit Wasser und dem Verwerfen des Totvolumens (200 µl 1N HCl), wird das sialylierte Produkt mit 1N HCl eluiert (700 µl). Nach saurer Hydrolyse des Produktes bei 95°C für 45 min und Abkühlung auf Eis, wird die Probe mit 250-290 µl 2 N NaOH und 300 µl 1 M Glycin/NaOH Puffer pH 10,0 neutralisiert. Die Fluoreszenz des freigesetzten Methylumbelliferons wird in schwarzen 96-well-plates (Microfluor, Dynex, U.S.A.) bei einer Anregungswellenlänge von 365 nm und einer Emissionswellenlänge von 450 nm gemessen. Die Aktivität des Enzyms entspricht der Intensität der gemessenen Fluoreszenz und kann an einer zuvor erstellten Eichkurve abgelesen werden (Methode nach Engstler et al. 1992).

Beispiel 4: Herstellung transgener Produktionsorganismen (Bakterien, Hefen, Pilzen, Pflanzen) für die Enzyme

Die hier erstmals beschriebenen DNS-Teilsequenzen von TS1 und TS2 ermöglichen mittels routinemäßig angewandten Standardtechniken die vollständige DNS-Sequenzen der Enzyme zu erstellen (insbesondere, da die hier vorgestellten DNS-Sequenzen keine nicht codierenden Introns enthalten). Die entsprechenden Standardtechniken sind z. B. die „Polymerase-Chain-Reaction“ Technik (PCR-Technik), „Southern-Blott“ über die genomische DNS oder cDNS und mRNA-Techniken, die mit Hilfe von kommerziell erhältlichen Kits beispielsweise von den Firmen Invitrogen oder Clontech durchgeführt werden können. Die Techniken sind dem Fachmann bekannt und sind unter anderem beschrieben in: Ausubel et al: Current Protocols in Molecular Biology, Edition 1989 und 2001. Die vollständige DNS der jeweiligen Enzyme oder funktionelle Teilsequenzen daraus werden mittels standard Transformationstechniken (Ausubel et al.) in die gewünschten Produktionsorganismen eingebracht. Die transgenen Organismen produzieren TS1 und TS2 und können aus den transgenen Organismen und/oder deren Kulturüberständen isoliert werden. Als Empfängerorganismen der DNS, die TS1 oder TS2 kodiert, kommen prokaryontische Bakterien, eukaryontische Mikroorganismen, Hefen und andere Pilze, eukaryontische Zellkulturen, Algen, Pflanzen, Samen, Tiere, Teile von Tieren, Gewebe, Hybridome, transgene Organismen und genbiologische, gentechnologische und transgene Rekombinanten sowie davon abgeleitete Organismen, Organe, Gewebe und Zellen zum Einsatz. Die hier beanspruchten Enzyme können aus den entsprechenden Ganzen oder Teilen von transgenen Organismen, aus ihren Kul-

turüberständen, aus Organen, Gewebe, Zellen, biologische Flüssigkeiten, Exsudaten, Eiern, Blut, Lymphe, Milch, Pflanzen, Algen und Samen sowie aus Teilen davon isoliert werden.

5 Beispiel 5: Reaktionsbeispiel der Enzyme

6kg von Glycomakropeptid (GMP) werden zusammen mit 1kg Galaktooligosaccharide mit einer Kettenlänge von 6-10 Zucker in handelsüblichem 50mM Bis Tris Puffer pH 7,0 (z. B. von der Firma Merk, Darmstadt) gelöst. Die Lösung wird mit 1 Liter des Trans-Sialidase enthaltenden Kulturüberstandes von *Trypanosoma congolense* versetzt und bei 37°C 3 Stunden lang inkubiert. Nach diesem Zeitraum hat die Trans-Sialidase Sialinsäuren von dem GMP auf die Galaktooligosaccharide übertragen. Die sialisierten Produkte können mit Hilfe üblicher chromatographischer Methoden (Ausubel et al.) oder Filtertechniken abgetrennt und gereinigt werden und stehen in reinem Zustand für Produktformulierungen zur Verfügung.

Glycomakropeptid (GMP) ist ein Abfallprodukt der Käseherstellung aus Kuhmilch. Nach Fällung des Caseins für die Käsezubereitung kann es aus der verbleibenden Molke mittels Filtertechniken isoliert werden.

Galaktooligosaccharide werden hergestellt, indem Laktose mittels des im Handel erhältlichen Enzyms beta-Galaktosidase umgesetzt wird. Bei dieser Umsetzung spaltet beta-Galaktosidase einerseits die Laktose in seine monomeren Zucker. Andererseits entstehen bei dieser Umsetzung in einer Nebenreaktion auch längerkettige Galaktooligosaccharide, die abgetrennt werden können und dann als Akzeptoren für die Trans-Sialidase Reaktion zur Verfügung stehen.

Beispiel 6: Verwendung der Enzyme

Die beiden isolierten Enzyme können beispielsweise zur Sialylierung von beta-Galaktose enthaltene Polymere (wie *Gum arabicum* etc.) und insbesondere für Polylactosamine und Galactane sowie für Galaktooligosaccharide (GOS), insbesondere für

beta-Galakto-Oligosaccharide, wie z. B. *Vivinal GOS* von der Firma *Borculo Domo Ingredients* (BDI) und *Oligomate 55* von der Firma *Yakult* eingesetzt werden.

5 Diese polymeren Galaktose-Zucker und neu gebildete Galaktooligosaccharide (Herstellung wie in Beispiel 5 beschrieben) können mit Hilfe der in diesem Patent beanspruchten Trans-Sialidasen sialyliert werden. Als Donoren für die Sialinsäuren können alle oben erwähnten Donoren und insbesondere das Glykomakropeptid aus Caseinen (von Mensch, Kuh, Ziege, Schaf, Pferd, Kamel und anderen Tieren) zum Einsatz kommen. Sialisierte Zuckerstrukturen weisen eine erhöhte Ähnlichkeit zu sauren Zuckern auf, die
10 auch im menschlichen Körper gefunden werden können und dort vielfältige Aufgaben haben.

Literatur

- 5 Blix, F. G., Gottschalk, A. und Klenk, E. (1957). Proposed nomenclature in the field of neuraminic and sialic acids. *Nature* 179: 1088
- Chuenkova M., Pereira M., (1999). Taylor G. trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi*: Location of galactose-binding site(S). *BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN*; 262: 549-556.
- Chuenkova M.V., Pereira M.A. (2001). The T. cruzi trans-sialidase induces PC12 cell differentiation via MAPK/ERK pathway. *Neuroreport* 12: 3715-3718.
- Corfield A.P., Myerscough N., Warren B.F., Durdey P., Paraskeva C. and Schauer R. (1999). Reduction of sialic acid O-acetylation in human colon mucins in the adenoma-carcinoma sequence, *Glycoconjugate J.* 16: 307-317
- 15 Crocker, P. R., Clark, E. A., Filbin, M., Gordon, S., Jones, Y., Kehrl, J. H., Kelm, S., Le Douarin, N., Powell, L., Roder, J., Schnaar, R. L., Sgroi, D. C., Stamenkovic, K., Schauer, R., Schachner, M., van den Berg, T. K., van der Merwe, P. A., Watt, S. M. und Varki, A. (1998). Siglecs: a family of sialic-acid binding lectins. *Glycobiology* 8, v.
- Engstler, M., Reuter, G. und Schauer, R. (1992). Purification and characterization of a novel sialidase found in procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 54: 21-30.
- 0 Engstler M., Reuter G., Schauer R. (1993). The developmentally regulated trans-sialidase from *Trypanosoma brucei* sialylates the procyclic acidic repetitive protein. *Mol Biochem Parasitol*; 61: 1-13.
- Engstler M., Schauer R., Brun R. (1995). Distribution of developmentally regulated trans-sialidases in the Kinetoplastida and characterization of a shed trans-sialidase activity from procyclic *Trypanosoma congolense*. *Acta Trop*; 59: 117-129.
- 25 Fahr C. and Schauer R. (2001). Detection of Sialic Acids and Gangliosides with Special Reference to 9-O-Acetylated Species in Basaliomas and Normal Human Skin, *J. Invest. Dermatol.* 116: 254-260
- 30 Gao W, Pereira MA. (2001). *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase potentiates T cell acti-

vation through antigen-presenting cells: role of IL-6 and Bruton's tyrosine kinase. *Eur J Immunol* 31: 1503-1512.

Herrler, G., Rott, R., Klenk, H. D., Müller, H. P., Shukla, A. K. und Schauer, R. (1985). The receptor-destroying enzyme of influenza C virus is neuraminidase-O-acetylase. *EMBO J.* 4, 1503-1506.

Higa, H. H., Rogers, G. N. und Paulson, J. C. (1985). Influenza virus hemagglutinins differentiate between receptor determinants bearing N-acetyl-, N-glycolyl-, and N,O-diacetyl-neuraminic acids. *Virology* 144: 279-282.

Hubl U., Ishida H., Kiso M., Hasegawa A., and Schauer R. (2000). Studies on the Specificity and Sensitivity of the Influenza C Virus Binding Assay for O-Acetylated Sialic Acids and Its Application to Human Melanomas, *J. Biochem.* 127: 1021-1031

Kelm, S. und Schauer, R. (1997). Sialic acids in molecular and cellular interactions. *Int. Rev. Cytol.* 175: 137-240.

Kelm, S., Schauer, R. und Crocker, P. R. (1996). The Sialoadhesins - a family of sialic acid-dependent cellular recognition molecules within the immunoglobulin superfamily. *Glycoconj. J.* 13: 913-926.

Lasky, L. A. (1995). Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response. *Ann. Rev. Biochem.* 64, 113-139.

Mattos-Guaraldi, A.L., Formiga, L.C.D. and Andrade, A.F.B. (1998). *FEMS Microbiology Letters*, 168: 167-172

Medina-Acosta E., Paul S., Tomlinson S., Pontes-de-Carvalho L.C. (1994). Combined occurrence of trypanosomal sialidase/trans-sialidase activities and leishmanial metalloproteinase gene homologues in *Endotrypanum* sp. *Mol Biochem Parasitol*; 64: 273-282.

Montagna G, Cremona ML, Paris G, Amaya MF, Buschiazzi A, Alzari PM, Frasch AC (2002). The trans-sialidase from the african trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Eur J Biochem*; 269: 2941-2950.

Pilatte, Y., Bignon, J. und Lambré, C. R. (1993). Sialic acids as important molecules in the regulation of the immune system: pathophysiological implications of sialidases in immunity. *Glycobiology* 3: 201-218.

Pontes de Carvalho L.C., Tomlinson S., Vandekerckhove F., Bienen E.J., Clarkson A.B., Jiang M.S., Hart G.W., Nussenzweig V. (1993). Characterization of a novel trans-sialidase of *Trypanosoma brucei* procyclic trypomastigotes and identification of procyclin as the main sialic acid acceptor. *J Exp Med*; 177: 465-474.

5 Reuter, G. und Schauer, R. (1988). Nomenclature of sialic acids. *Glycoconj. J.* 5: 133-135.

Reuter, G., Kelm, S. und Schauer, R. (1988). Chemistry and biology of cell surface glyco-conjugates. *Acta Histochem. Suppl.* 36: 51-79.

Schauer R. (2000). Achievements and challenges of sialic acid research, *Glycoconjugate J.* 17: 485-499

Schauer, R. (1982). Chemistry, metabolism, and biological functions of sialic acids. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 40: 131-234.

Schauer, R. (1985). Sialic acids and their role as biological masks. *Trends Biochem. Sci.* 10, 357-360.

15 Schauer, R. (1991). Biosynthesis and function of N- and O-substituted sialic acids. *Glyco-biology* 1: 449-452.

Schauer, R. und Kamerling, J. P. (1997). Chemistry, biochemistry and biology of sialic acids. *In Glycoproteins II.* J. Montreuil, J. F. G. Vliegenthart, und H. Schachter, eds. (Amsterdam: Elsevier), pp. 243-402.

Schauer, R., Kelm, S., Reuter, G., Roggentin, P. und Shaw, L. (1995). Biochemistry and role of sialic acids. *In Biology of sialic acids.* A. Rosenberg, ed. (New York: Plenum Press), pp. 7-67.

25 Schenkman, S., Jiang, M. S., Hart, G. W. und Nussenzweig, V. (1991). A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. *Cell* 65: 1117-1125.

Sharon, N. und Lis, H. (1997). Microbial lectins and their glycoprotein receptors. *In Glyco-proteins II.* J. Montreuil, J. F. G. Vliegenthart und H. Schachter, eds. (Amsterdam: Elsevier), pp. 475-506.

Shaw, L. und Schauer, R. (1988). The biosynthesis of N-glycoloylneuraminic acid oc-

curs by hydroxylation of the CMP-glycoside of N-acetylneuraminic acid. Biol. Chem. Hoppe-Seyler 369: 477-486.

5. Tertov V.V., Kaplun V.V., Sobenin I.A., Boytsova, E.Y., Bovin N.V. & Orekhov A.N. (2001). Human plasma trans-sialidase causes atherogenic modification of low density lipoprotein. Atherosclerosis 159: 103-115

Traving, C. und Schauer, R. (1998). Structure, function and metabolism of sialic acids. CMLS, Cell. Mol. Life Sci. 54: 1330-1349.

Varki, A., Hooshmand, F., Diaz, S., Varki, N. M. und Hedrick, S. M. (1991). Developmental abnormalities in transgenic mice expressing a sialic acid-specific 9-O-acetylerase. Cell 65: 65-74.

PATENTANSPRÜCHE

1. Polynukleotid, welches für ein Protein mit Trans-Sialidase-Aktivität
5 kodiert und aus *Trypanosoma congolense* isolierbar ist.
2. Polynukleotid nach Anspruch 1, welches für ein Protein mit Trans-Sialidase-Aktivität kodiert, das den Transfer von Sialinsäure von einem Donor auf ein Akzeptormolekül katalysiert.
3. Polynukleotid, nach Anspruch 1 oder 2, umfassend eine
10 Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1 oder 3, oder Fragmente davon, welche wenigstens 15 zusammenhängende Nukleotidreste umfassen; die dazu komplementären Polynukleotide und Fragmente; und die von diesen Polynukleotiden durch Entartung des genetischen Codes abgeleiteten Nukleotidsequenzen.
- 15 4. Oligonukleotid, welches mit einem Polynukleotid nach einem der vorhergehenden Ansprüche, insbesondere unter stringenten Bedingungen, hybridisiert.
5. Polynukleotid, welches mit einem Oligonukleotid nach Anspruch 4, insbesondere unter stringenten Bedingungen, hybridisiert und für ein
20 Genprodukt aus Mikroorganismen der Gattung *Trypanosoma* kodiert.
6. Polypeptid, welches von einem Polynukleotid kodiert wird, das eine Nukleinsäuresequenz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 oder 5 umfasst; oder welches eine Aminosäuresequenz aufweist, die wenigstens 10 zusammenhängende Aminosäuren gemäß SEQ ID NO: 2 oder 4 umfasst; sowie
25 funktionale Äquivalente davon, welche Trans-Sialidase-Aktivität besitzen.
7. Trans-Sialidase oder funktionale Äquivalente davon mit Trans-Sialidase-Aktivität, gekennzeichnet durch eine der folgenden Aminosäureteilsequenzen:

TDTVAKYSTDGGRTWKREVIIPNGR (Pos. 1 bis 25 gemäß SEQ ID NO:2)
 FRIPSLVEIDGVLIATFDTRYLRASDSSLI (Pos. 1 bis 30 gemäß SEQ ID NO:4).

8. Trans-Sialidase 1 (TS1) gekennzeichnet durch wenigstens eines der folgenden Charakteristika:

Nukleotidsequenz	SEQ ID NO:1
Aminosäuresequenz	SEQ ID NO:2
Temperaturoptimum	30-40°C
pH Optimum	pH 6.5-8.5
Isoelektrischer Punkt	pH 4-5
Molekulargewicht nativ	400-600 kDa
Molekulargewicht im reduzierenden SDS- page	90 kDa

5

9. Trans-Sialidase 2 (TS2), gekennzeichnet durch wenigstens eines der folgenden Charakteristika:

Nukleotidsequenz	SEQ ID NO:3
Aminosäuresequenz	SEQ ID NO:4
Temperaturoptimum	30-40°C
pH Optimum	pH 6.5-8.5
Isoelektrischer Punkt	pH 5-6
Molekulargewicht nativ	120-180 kDa
Molekulargewicht im reduzierenden SDS- page	90 kDa

10. Stoff nach einem der Ansprüche 1 bis 9, abgeleitet aus dem Organismus *Trypanosoma congolense*.

11. Stoffe nach einem der Ansprüche 1 bis 9, hergestellt unter Anwendung synthetischer, insbesondere chemischer, biochemischer, enzymatischer, gentechnologischer und transgener Methoden.

12. Funktionales Äquivalent einer Trans-Sialidase nach einem der Ansprüche 8 und 9, deren Aminosäuresequenz oder -teilsequenz zur korrespondierenden Aminosäuresequenz oder -teilsequenz gemäß SEQ ID NO: 2 oder 4 eine Sequenzidentität von wenigsten 50 % oder wenigstens 60 %, insbesondere wenigstens 65 % oder wenigstens 70 %, wie z.B. 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% oder 99%, berechnet nach dem Algorithmus von Pearson und Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 85(8), 1988, 2444-2448, aufweist; oder das eine oder mehrere Deletionen, Additionen, Substitutionen oder Inversionen einzelner oder mehrerer Aminosäurereste enthält oder ein verändertes Glykosylierungsmuster zeigt; wobei die Befähigung zur Katalyse der Übertragung von Sialinsäuren von einem Donor auf einen Akzeptor erhalten bleibt.

13. Expressionskassette, umfassend in operativer Verknüpfung mit wenigstens einer regulativen Nukleinsäuresequenz eine Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 5.

14. Rekombinanter Vektor, umfassend wenigstens eine Expressionskassette nach Anspruch 13.

15. Prokaryotischer oder eukaryotischer Wirt, transformiert mit wenigstens einem Vektor nach Anspruch 14.

16. Verwendung einer Expressionskassette nach Anspruch 13, eines Vektors nach Anspruch 14 oder eines Wirts nach Anspruch 15 zur rekombinanten Herstellung eines Proteins mit Trans-Sialidase-Aktivität.

17. Verfahren zur enzymatischen Sialisierung eines Akzeptormoleküls, dadurch gekennzeichnet, dass man das Akzeptormolekül mit einem

Sialinsäurereste enthaltenden Donor in Gegenwart eines Enzyms nach einem der Ansprüche 6 bis 12 inkubiert und den sialylierten Akzeptor isoliert.

18. Verfahren nach Anspruch 17, gekennzeichnet durch wenigstens eine weitere der folgenden Eigenschaften:

5 a) der Donor ist ausgewählt unter an Oligosaccharide, Polysaccharide, Polysialinsäuren, Glykoproteine und Glykolipide gebundene Sialinsäuren, wie insbesondere Lactoferrine, glykolisierte Molkenproteine und Caseine und Fragmente davon;

10 b) der Akzeptor ist ausgewählt unter β -Galaktose enthaltenden Polymeren, wie β -Galaktooligosacchariden, Laktitol, Laktobionsäure, Methyl- β -lactosid, Acetyllaktosaminen, Galaktopyranosiden, Trans-Galaktooligosacchariden, Polygalaktose und anderen Glykokonjugaten mit endständig gebundener $\beta(1-3)$ oder $\beta(1-4)$ -Galaktose oder Galaktose.

15 19. Verwendung einer Trans-Sialidase nach einem der Ansprüche 6 bis 12, einer dafür kodierenden Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 5 oder eines nach einem der Ansprüche 18 und 19 hergestellten Sialisierungsprodukts zur Herstellung eines Medikaments, Nahrungsmittels oder Nahrungsergänzungsmittels oder einer Nahrungsmittelzutat zur
20 Prävention oder Behandlung Sialinsäure-gesteuerter parasitärer, bakterieller oder viraler Infektionen; zur Behandlung von Tumorerkrankungen; zur Behandlung von Erkrankungen, welche mit einer Entwicklungsstörung des Gewebes assoziiert sind; zur Behandlung von Erkrankungen des Immunsystems; zur Behandlung von Autoimmunreaktionen; zur Behandlung von Erkrankungen mit gestörter Zellkommunikation; oder zur Behandlung von
25 Entzündungen.

20. Verwendung einer Trans-Sialidase nach einem der Ansprüche 6 bis 12, zur Entwicklung eines Trypanosomiasis-Impfstoffs oder zur Entwicklung von Enzyminhibitoren zur Behandlung oder Prävention von Trypanosoma-Infektionen.

21. Verwendung einer Trans-Sialidase nach einem der Ansprüche 6 bis 12, einer dafür kodierenden Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 5 oder eines nach einem der Ansprüche 18 und 19 hergestellten sialylierten Produkts zur Herstellung eines Medikaments, Nahrungsergänzungsmittels oder Nahrungsmittels zur Schutz körpereigener Zellen oder Gewebe oder Glykoproteine vor enzymatischer Einwirkung.

22. Verwendung einer Trans-Sialidase nach einem der Ansprüche 6 bis 12, einer dafür kodierenden Nukleinsäuresequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 5 oder eines nach einem der Ansprüche 17 und 18 hergestellten sialylierten Produkts zur Herstellung eines Medikaments, Nahrungsergänzungsmittels oder Nahrungsmittels zu Beeinflussung der Entwicklung und/oder Morphogenese von Körpergeweben.

23. Effektor der Trans-Sialidase-Aktivität einer Trans-Sialidase nach einem der Ansprüche 6 bis 12, ausgewählt unter

- 15 a) Polypeptid-Liganden, welche mit einer Trans-Sialidase nach einem der Ansprüche 6 bis 12 wechselwirken;
 - b) niedermolekularen Effektoren, welche die biologische Aktivität einer Trans-Sialidase nach einem der Ansprüche 6 bis 12 modulieren; und
 - c) Antisense-Nukleinsäuresequenzen zu einer Nukleinsäuresequenz
- 20 nach einem der Ansprüche 1 bis 5.

24. Verwendung eines Effektors nach Anspruch 23 zur Herstellung eines pharmazeutisches oder gentherapeutisches Mittels, Nahrungsergänzungsmittels oder Nahrungsmittels zur Behandlung oder Prävention von mit Trans-Sialidase-Aktivität assoziierten Erkrankungen.

25. Verfahren zur Isolierung eines Enzyms mit Trans-Sialidase-Aktivität, wobei man

- a) *Trypanosoma congolense* in einem Medium kultiviert,
 - b) und das gewünschte Produkt aus dem Kulturüberstand durch Ionenaustauschchromatographie mit Hilfe eines Salzgradienten, gegebenenfalls
- 30 gefolgt von Isoelektrischer Fokussierung, Gelfiltration, Affinitätschromatographie

und/oder Proteinfällung, isoliert.

26. Pharmazeutisches oder gentherapeutisches Mittel, enthaltend in einem pharmazeutisch oder gentherapeutisch verträglichen Träger wenigsten einen

5 Effektor nach Anspruch 23.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft neuartige Enzyme, die Sialinsäuren von einem Donormolekül auf ein Akzeptormolekül übertragen (Trans-Sialidasen). Die Enzyme wurden aus dem Einzeller *Trypanosoma congolense* isoliert. Weiterhin betrifft die Erfindung funktionale Äquivalente dieser Enzyme; die für diese Enzyme und deren funktionalen Äquivalente kodierenden Nukleinsäuresequenzen und Aminosäuresequenzen; Expressionskonstrukte und Vektoren, welche diese Sequenzen enthalten; rekombinante Mikroorganismen welche eine erfindungsgemäße kodierende Nukleinsäuresequenz tragen; Verfahren zur rekombinanten Herstellung erfindungsgemäßer Enzyme; Verfahren zur Isolierung erfindungsgemäßer Enzyme aus *Trypanosoma congolense*; Verfahren zur enzymatischen Sialisierung von Akzeptormolekülen unter Verwendung erfindungsgemäßer Enzyme; Effektoren der erfindungsgemäßen Trans-Sialidasen; die Verwendung erfindungsgemäßer Nukleinsäuresequenzen, Aminosäuresequenzen, Enzyme, Effektoren oder Sialisierungsprodukte zur Herstellung von Impfstoffen, Medikamenten, Nahrungs- oder Nahrungsergänzungsmitteln; sowie die erfindungsgemäß hergestellten Mittel selbst.

Bild 1

T. con. TS1 : * 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120
 T. con. TS2 : FRIISLVEIDGVLIATEDRRYLRAHDSLSLEAMADOKTITICERTRRVDPGVDHAYRANIIYVITVTRGYHNRRNKAGIAEDEVSTNVGKKNARD : 91
 : 117

T. con. TS1 : * 140 * 160 * 180 * 200 * 220 * 240
 T. con. TS2 : IISBORTALKSLYNEPBGSP---TFLGAGGVSNLACARKANRVSIIADHSGEAGVTSYIBABDGGQYMTFES : 208
 : 237

T. con. TS1 : * 260 * 280 * 300 * 320 * 340 * 360
 T. con. TS2 : MINPGSSSGPRTVKNLKGSYYDRLOIMWDDGNRHHVGVSEGGDDNSAYSSLTYPDGVYCLHSONIDEVYSLHLVRLVDELKSKTALV : 328
 : 277

T. con. TS1 : * 380 * 400 * 420 * 440 * 460 * 480
 T. con. TS2 : WKAODELLGNCLPGDKYDPGCDGIPFAGLAGLVGPLEKTEKTPDAYRCVNAATSGAVSTAEGVRLDVGGGGHVWVHVSEQQDQRYFTNSSETLAVTVRFDEMPRGELPLLGFVNRKG : 448
 : 449

T. con. TS1 : * 500 * 520
 T. con. TS2 : KVKKILKVBLSGVEMLLAYGNEYNSTAABPLDVNESHOWVLALHDGIVS : 497
 : 498

Bild 2

Sialidase

Hydrolyse von Donor gebundenen Sialinsäuren



Sialyltransferase

Transfer von mit CMP aktivierten Sialinsäuren auf Akzeptormoleküle



Trans-sialidase

Transfer von Sialinsäuren von Donor auf Akzeptormoleküle



Bild 3

		20	40	60	80	100	120	
T.r.s	:	MSRLAVEVPLFLMACASEPASAALPGSSSRVFLFRONSTVFFP						44
T.cr.ts	:	MGKTVVGASRKFPLMFVPLLLALCPSEPAHALPGSSSRVFLFRONSKVFF						53
T.b.br.ts	:	MEELHQHMPISRLILITAVCHCCALTSKAAGKGTREAPLGGGAWALRKLSEKDGVEVWQDGPNNKDKYDEWERWFKKEKGPFGSEKRESEF						120
T.con.ts1	:							
T.con.ts2	:							
		140	160	180	200	220	240	
T.r.s	:	SNGTIRREVRHSITINAVVAVATAMVPSNSREFAVEVVEDGAGNOSTARTS-BASSVPHAAITVFKKVIISPKTNSSTOHRD-GSE						160
T.cr.ts	:	EGGKVTIVVMSIALALNNVAVATAMVPSNSREFAVEVVEDGAGNOSTARTS-BASSVPHAAITVFKKVIISPKTNSSTOHRD-GSE						169
T.b.br.ts	:	GSDKV-RTVHSRHSITINAVVAVATAMVPSNSREFAVEVVEDGAGNOSTARTS-BASSVPHAAITVFKKVIISPKTNSSTOHRD-GSE						239
T.con.ts1	:							79
T.con.ts2	:							105
		260	280	300	320	340	360	
T.r.s	:	VKSANGTITATSKK-VKELFPFEDCILTKEVFAAFCRILLYVADNGGRFKEKRESEKAEKSKFCEPAVILKEKRENNVGH						272
T.cr.ts	:	VKSANGTITATSKK-VKELFPFEDCILTKEVFAAFCRILLYVADNGGRFKEKRESEKAEKSKFCEPAVILKEKRENNVGH						281
T.b.br.ts	:	VKSANGTITATSKK-VKELFPFEDCILTKEVFAAFCRILLYVADNGGRFKEKRESEKAEKSKFCEPAVILKEKRENNVGH						356
T.con.ts1	:							191
T.con.ts2	:							220
		380	400	420	440	460	480	
T.r.s	:	RELHPTNMEKGVVSTLSTWYTSNOO-D-CORREVAHKKHPTLRLRMHSHHPTNMEKGVVSTLSTWYTSNOO-D						383
T.cr.ts	:	RELHPTNMEKGVVSTLSTWYTSNOO-D-CORREVAHKKHPTLRLRMHSHHPTNMEKGVVSTLSTWYTSNOO-D						392
T.b.br.ts	:	RELHPTNMEKGVVSTLSTWYTSNOO-D-CORREVAHKKHPTLRLRMHSHHPTNMEKGVVSTLSTWYTSNOO-D						476
T.con.ts1	:							304
T.con.ts2	:							277
		500	520	540	560	580	600	
T.r.s	:	NDVVFVFFICOLMAYVVRTEEENRHSITVVEATPSEKCGAUAFAITVSHSANGSVETVNDVVAERVPHLKNVVEGAV						502
T.cr.ts	:	NDVVFVFFICOLMAYVVRTEEENRHSITVVEATPSEKCGAUAFAITVSHSANGSVETVNDVVAERVPHLKNVVEGAV						511
T.b.br.ts	:	NDVVFVFFICOLMAYVVRTEEENRHSITVVEATPSEKCGAUAFAITVSHSANGSVETVNDVVAERVPHLKNVVEGAV						592
T.con.ts1	:							419
T.con.ts2	:							
		620	640	660	680	700	720	
T.r.s	:	YRVAATIDELKGTSLAGLEGPDALFEGYDKNROEPLAAP-ASFGWELHKKYVPHADROGVYVDCOPLAGSNVTVRGA-TLPDI						620
T.cr.ts	:	YRVAATIDELKGTSLAGLEGPDALFEGYDKNROEPLAAP-ASFGWELHKKYVPHADROGVYVDCOPLAGSNVTVRGA-TLPDI						629
T.b.br.ts	:	YRVAATIDELKGTSLAGLEGPDALFEGYDKNROEPLAAP-ASFGWELHKKYVPHADROGVYVDCOPLAGSNVTVRGA-TLPDI						711
T.con.ts1	:							497
T.con.ts2	:							
		740	760	780	800	820	840	
T.r.s	:	SPGVTIVVIRRNSSRTTFLSQDMCTDGGAGTAA-SHSTPNNVILVIRRNSSRTTFLSQDMCTDGGAGTAA-SHSTP						660
T.cr.ts	:	SPGVTIVVIRRNSSRTTFLSQDMCTDGGAGTAA-SHSTPNNVILVIRRNSSRTTFLSQDMCTDGGAGTAA-SHSTP						749
T.b.br.ts	:	SPGVTIVVIRRNSSRTTFLSQDMCTDGGAGTAA-SHSTPNNVILVIRRNSSRTTFLSQDMCTDGGAGTAA-SHSTP						831
T.con.ts1	:							
T.con.ts2	:							
		860	880	900	920	940	960	
T.r.s	:	SAPADSNHSTPSTPADNGHSTPSTPADNGHSTPSTPADNGHSTPSTPADNGHSTPSTPADNGHSTPSTPADNGHSTP						869
T.cr.ts	:	SAPADSNHSTPSTPADNGHSTPSTPADNGHSTPSTPADNGHSTPSTPADNGHSTPSTPADNGHSTPSTPADNGHSTP						874
T.b.br.ts	:	SAPADSNHSTPSTPADNGHSTPSTPADNGHSTPSTPADNGHSTPSTPADNGHSTPSTPADNGHSTPSTPADNGHSTP						
T.con.ts1	:							
T.con.ts2	:							
		980	1000	1020	1040	1060	1080	
T.r.s	:	SAPADSNHSTPSTPADNGHSTPSTPADNGHSTPSTPADNGHSTPSTPADNGHSTPSTPADNGHSTPSTPADNGHSTP						989
T.cr.ts	:	SAPADSNHSTPSTPADNGHSTPSTPADNGHSTPSTPADNGHSTPSTPADNGHSTPSTPADNGHSTPSTPADNGHSTP						
T.b.br.ts	:	SAPADSNHSTPSTPADNGHSTPSTPADNGHSTPSTPADNGHSTPSTPADNGHSTPSTPADNGHSTPSTPADNGHSTP						
T.con.ts1	:							
T.con.ts2	:							
		1100	1120	1140				
T.r.s	:	SAPADSNHSTPSTPADNGHSTPSTPADNGHSTPSTPADNGHSTPSTPADNGHSTPSTPADNGHSTPSTPADNGHSTP						1060
T.cr.ts	:	SAPADSNHSTPSTPADNGHSTPSTPADNGHSTPSTPADNGHSTPSTPADNGHSTPSTPADNGHSTPSTPADNGHSTP						
T.b.br.ts	:	SAPADSNHSTPSTPADNGHSTPSTPADNGHSTPSTPADNGHSTPSTPADNGHSTPSTPADNGHSTPSTPADNGHSTP						
T.con.ts1	:							
T.con.ts2	:							

Trans-Sialidasen.ST25.txt
SEQUENCE LISTING

<110> Schauer, Roland

<120> Trans-Sialidasen aus Trypanosoma congolense

<130> NUT-047

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1491

<212> DNA

<213> Trypanosoma congolense

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1491)

<223>

<400> 1

```

ccg gac acc gtt gct aaa tac agc act gac ggt ggg aga acg tgg aag      48
Thr Asp Thr Val Ala Lys Tyr Ser Thr Asp Gly Gly Arg Thr Trp Lys
1                               5                               10
agg gag gtt ata att ccg aat ggt cgt gtg gat gcc cac tac tcc cgc      96
Arg Glu Val Ile Ile Pro Asn Gly Arg Val Asp Ala His Tyr Ser Arg
20                               25                               30
gtc gtt gat ccc act gtt gtt gcg aag ggt aat aac att tat gtt ctc      144
Val Val Asp Pro Thr Val Val Ala Lys Gly Asn Asn Ile Tyr Val Leu
35                               40                               45
gtt ggg cgg tac aat gtc acg cgg ggc tac tgg cac aat agg aac aac      192
Val Gly Arg Tyr Asn Val Thr Arg Gly Tyr Trp His Asn Arg Asn Asn
50                               55                               60
aag gct ggc ata gcc gat tgg gag ccc ttc gtg tac aag ggc acg gtg      240
Lys Ala Gly Ile Ala Asp Trp Glu Pro Phe Val Tyr Lys Gly Thr Val
65                               70                               75
aac gtg ggc acg aag ggc aat gcc act gat gtg tcg atc agc tgg gag      288
Asn Val Gly Thr Lys Gly Asn Ala Thr Asp Val Ser Ile Ser Trp Glu
85                               90                               95
agg act gca ctg aag tcg ctg tac aac ttc ccg gtt tcg gga agc cct      336
Arg Thr Ala Leu Lys Ser Leu Tyr Asn Phe Pro Val Ser Gly Ser Pro
100                              105                              110
ggc acg cag ttc ctt gga ggg gct ggg ggt ggt gtt gta aca tcc aac      384
Gly Thr Gln Phe Leu Gly Gly Ala Gly Gly Gly Val Val Thr Ser Asn
115                              120                              125
ggg acg att gtg ctg cca gtg cag gca agg aac aag gcc aac cgt gtt      432
Gly Thr Ile Val Leu Pro Val Gln Ala Arg Asn Lys Ala Asn Arg Val
130                              135                              140
gtg agc atg atc ctg tac tcg gct gac gat gga aag tca tgg cac ttt      480
Val Ser Met Ile Leu Tyr Ser Ala Asp Asp Gly Lys Ser Trp His Phe
145                              150                              155
ggg aag ggt gag gcc ggt gta ggc acg tcc gag gct gcc ctc act gag      528
Gly Lys Gly Glu Ala Gly Val Gly Thr Ser Glu Ala Ala Leu Thr Glu
165                              170                              175
tgg gac ggc aag ctg ctg att agt gca cga tcc gat ggt gga cag ggc      576

```

Trans-Sialidasen.ST25.txt

Trp	Asp	Gly	Lys	Leu	Leu	Ile	Ser	Ala	Arg	Ser	Asp	Gly	Gly	Gln	Gly	
180							185						190			
tac	cgc	atg	ata	ttc	gaa	tcg	agt	gac	ctt	ggt	gcg	acg	tgg	aaa	gag	624
Tyr	Arg	Met	Ile	Phe	Glu	Ser	Ser	Asp	Leu	Gly	Ala	Thr	Trp	Lys	Glu	
		195					200					205				
atg	ctc	aac	agc	atc	tcc	cgc	gtg	att	ggc	aac	tct	ccg	ggt	cgc	agt	672
Met	Leu	Asn	Ser	Ile	Ser	Arg	Val	Ile	Gly	Asn	Ser	Pro	Gly	Arg	Ser	
		210				215					220					
ggt	cct	ggc	agc	tcg	agt	ggc	ttc	atc	acg	gtg	aca	gtg	gag	ggt	gtg	720
Gly	Pro	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Phe	Ile	Thr	Val	Thr	Val	Glu	Gly	Val	
		225			230				235						240	
cct	gtg	atg	ctg	att	acc	cac	ccg	aag	aac	ctt	aag	ggc	tcg	tat	tat	768
Pro	Val	Met	Leu	Ile	Thr	His	Pro	Lys	Asn	Leu	Lys	Gly	Ser	Tyr	Tyr	
				245					250					255		
cgg	gac	cgt	ctg	cag	ctg	tgg	atg	acg	gac	ggc	aat	cgt	atg	tgg	cat	816
Arg	Asp	Arg	Leu	Gln	Leu	Trp	Met	Thr	Asp	Gly	Asn	Arg	Met	Trp	His	
			260					265					270			
c	ggg	cag	gtc	tct	gag	ggc	gac	gat	aac	agc	gct	tac	agc	tcc	ctg	864
Al	Gly	Gln	Val	Ser	Glu	Gly	Asp	Asp	Asn	Ser	Ala	Tyr	Ser	Ser	Leu	
		275					280					285				
ctg	tac	act	ccg	gac	ggg	gtc	ctg	tac	tgc	tgg	cat	gag	cag	aac	att	912
Leu	Tyr	Thr	Pro	Asp	Gly	Val	Leu	Tyr	Cys	Leu	His	Glu	Gln	Asn	Ile	
		290				295					300					
gat	gag	gtg	tac	agc	ctc	cac	ctt	gtg	cgc	ctt	gtg	gac	gag	ctg	aaa	960
Asp	Glu	Val	Tyr	Ser	Leu	His	Leu	Val	Arg	Leu	Val	Asp	Glu	Leu	Lys	
		305			310				315						320	
agc	att	aaa	tca	acg	gct	ctg	gtg	tgg	aag	gca	cag	gac	gag	ctt	ctc	1008
Ser	Ile	Lys	Ser	Thr	Ala	Leu	Val	Trp	Lys	Ala	Gln	Asp	Glu	Leu	Leu	
				325					330					335		
ctg	ggc	aac	tgc	ctc	ccg	ggc	gat	aaa	tac	gat	ccc	ggg	tgt	gac	ggc	1056
Leu	Gly	Asn	Cys	Leu	Pro	Gly	Asp	Lys	Tyr	Asp	Pro	Gly	Cys	Asp	Gly	
			340					345					350			
atc	ccc	acc	gct	ggg	ctt	gcc	ggg	ctg	ctg	gta	gga	ccc	ctg	acg	gag	1104
Ile	Pro	Thr	Ala	Gly	Leu	Ala	Gly	Leu	Leu	Val	Gly	Pro	Leu	Thr	Glu	
		355					360					365				
aag	acg	tgg	ccc	gac	gcg	tat	cgg	tgc	gtg	aac	gct	gca	acc	agc	ggc	1152
Lys	Thr	Trp	Pro	Asp	Ala	Tyr	Arg	Cys	Val	Asn	Ala	Ala	Thr	Ser	Gly	
		370				375					380					
gct	gtg	agc	act	gct	gaa	ggc	gtg	cgg	ctg	gac	gtg	ggt	ggc	ggt	ggc	1200
Ala	Val	Ser	Thr	Ala	Glu	Gly	Val	Arg	Leu	Asp	Val	Gly	Gly	Gly	Gly	
					390				395						400	
cat	gtt	gtg	tgg	ccc	gtg	agt	gag	cag	ggg	cag	gac	cag	cgg	tat	tac	1248
His	Val	Val	Trp	Pro	Val	Ser	Glu	Gln	Gly	Gln	Asp	Gln	Arg	Tyr	Tyr	
				405				410						415		
ttt	acc	aac	agc	gag	ttc	acg	ctc	gcc	gtc	acg	gtg	cgg	ttt	gac	gag	1296
Phe	Thr	Asn	Ser	Glu	Phe	Thr	Leu	Ala	Val	Thr	Val	Arg	Phe	Asp	Glu	
			420					425					430			
atg	cca	cgg	ggg	gag	ctc	ccg	ttg	ctg	ggg	ttt	gtg	aac	cgc	aaa	ggg	1344
Met	Pro	Arg	Gly	Glu	Leu	Pro	Leu	Leu	Gly	Phe	Val	Asn	Arg	Lys	Gly	
		435					440					445				
aag	gtg	aag	aag	ata	ctg	aag	gtg	tcg	ctg	agc	ggg	gtg	gag	tgg	ctc	1392

Trans-Sialidasen.ST25.txt

Lys Val Lys Lys Ile Leu Lys Val Ser Leu Ser Gly Val Glu Trp Leu
 450 455 460
 ctg gca tac ggg aat gag tac aac agc aca gcc gct gag ccg ctg gac 1440
 Leu Ala Tyr Gly Asn Glu Tyr Asn Ser Thr Ala Ala Glu Pro Leu Asp 480
 465 470
 gtg aac gag agc cac cag gtg gtg cta gcg ctt cac gac ggg atc gtc 1488
 Val Asn Glu Ser His Gln Val Val Leu Ala Leu His Asp Gly Ile Val 495
 485 490
 tcc
 Ser 1491

<210> 2
 <211> 497
 <212> PRT
 <213> Trypanosoma congolense
 <400> 2

Asp Thr Val Ala Lys Tyr Ser Thr Asp Gly Gly Arg Thr Trp Lys
 5 10 15
 Arg Glu Val Ile Ile Pro Asn Gly Arg Val Asp Ala His Tyr Ser Arg
 20 25 30
 Val Val Asp Pro Thr Val Val Ala Lys Gly Asn Asn Ile Tyr Val Leu
 35 40 45
 Val Gly Arg Tyr Asn Val Thr Arg Gly Tyr Trp His Asn Arg Asn Asn
 50 55 60
 Lys Ala Gly Ile Ala Asp Trp Glu Pro Phe Val Tyr Lys Gly Thr Val
 65 70 75 80
 Asn Val Gly Thr Lys Gly Asn Ala Thr Asp Val Ser Ile Ser Trp Glu
 85 90 95
 Arg Thr Ala Leu Lys Ser Leu Tyr Asn Phe Pro Val Ser Gly Ser Pro
 100 105 110
 Gly Thr Gln Phe Leu Gly Gly Ala Gly Gly Gly Val Val Thr Ser Asn
 115 120 125
 Gly Thr Ile Val Leu Pro Val Gln Ala Arg Asn Lys Ala Asn Arg Val
 130 135 140
 Val Ser Met Ile Leu Tyr Ser Ala Asp Asp Gly Lys Ser Trp His Phe
 145 150 155 160
 Gly Lys Gly Glu Ala Gly Val Gly Thr Ser Glu Ala Ala Leu Thr Glu
 165 170 175
 Trp Asp Gly Lys Leu Leu Ile Ser Ala Arg Ser Asp Gly Gly Gln Gly

Trans-Sialidasen.ST25.txt

180

185

190

Tyr Arg Met Ile Phe Glu Ser Ser Asp Leu Gly Ala Thr Trp Lys Glu
195 200 205

Met Leu Asn Ser Ile Ser Arg Val Ile Gly Asn Ser Pro Gly Arg Ser
210 215 220

Gly Pro Gly Ser Ser Ser Gly Phe Ile Thr Val Thr Val Glu Gly Val
225 230 235 240

Pro Val Met Leu Ile Thr His Pro Lys Asn Leu Lys Gly Ser Tyr Tyr
245 250 255

Arg Asp Arg Leu Gln Leu Trp Met Thr Asp Gly Asn Arg Met Trp His
260 265 270

Gly Gln Val Ser Glu Gly Asp Asp Asn Ser Ala Tyr Ser Ser Leu
275 280 285

Leu Tyr Thr Pro Asp Gly Val Leu Tyr Cys Leu His Glu Gln Asn Ile
290 295 300

Asp Glu Val Tyr Ser Leu His Leu Val Arg Leu Val Asp Glu Leu Lys
305 310 315 320

Ser Ile Lys Ser Thr Ala Leu Val Trp Lys Ala Gln Asp Glu Leu Leu
325 330 335

Leu Gly Asn Cys Leu Pro Gly Asp Lys Tyr Asp Pro Gly Cys Asp Gly
340 345 350

Ile Pro Thr Ala Gly Leu Ala Gly Leu Leu Val Gly Pro Leu Thr Glu
355 360 365

Thr Trp Pro Asp Ala Tyr Arg Cys Val Asn Ala Ala Thr Ser Gly
370 375 380

Ala Val Ser Thr Ala Glu Gly Val Arg Leu Asp Val Gly Gly Gly Gly
385 390 395 400

His Val Val Trp Pro Val Ser Glu Gln Gly Gln Asp Gln Arg Tyr Tyr
405 410 415

Phe Thr Asn Ser Glu Phe Thr Leu Ala Val Thr Val Arg Phe Asp Glu
420 425 430

Met Pro Arg Gly Glu Leu Pro Leu Leu Gly Phe Val Asn Arg Lys Gly
435 440 445

Lys Val Lys Lys Ile Leu Lys Val Ser Leu Ser Gly Val Glu Trp Leu

450

455

Trans-Sialidasen.ST25.txt

460

Leu Ala Tyr Gly Asn Glu Tyr Asn Ser Thr Ala Ala Glu Pro Leu Asp
 465 470 475 480

Val Asn Glu Ser His Gln Val Val Leu Ala Leu His Asp Gly Ile Val
 485 490 495

Ser

<210> 3
 <211> 831
 <212> DNA
 <213> Trypanosoma congolense

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(831)
 <223>

<400> 3
 ttc cga att ccc tca ctt gtt gag ata gac gcc gtg ctt atc gcg aca 48
 Phe Arg Ile Pro Ser Leu Val Glu Ile Asp Gly Val Leu Ile Ala Thr
 1 5 10 15

ttc gat aca cgt tat ctt cgc gct tcc gac agc agt ctc ata gac aca 96
 Phe Asp Thr Arg Tyr Leu Arg Ala Ser Asp Ser Ser Leu Ile Asp Thr
 20 25 30

gct atg aaa tac agt gcc gat cag ggg aag acg tgg aaa act gaa atc 144
 Ala Met Lys Tyr Ser Ala Asp Gln Gly Lys Thr Trp Lys Thr Glu Ile
 35 40 45

ata ata aaa aat gct aga cta act gat aac ttt tcc cgc gtc gtt gat 192
 Ile Ile Lys Asn Ala Arg Leu Thr Asp Asn Phe Ser Arg Val Val Asp
 50 55 60

cca acg gtt gtt gtt aag ggt gat aac ttg ttt att ttt gtt ggg agg 240
 Pro Thr Val Val Val Lys Gly Asp Asn Leu Phe Ile Phe Val Gly Arg
 65 70 75 80

aac acc tca tct gcc cca tgg gtc tgg cag gaa aac ggt aaa gac 288
 Asn Thr Ser Ser Ala Pro Trp Val Trp Gln Glu Asn Gly Lys Asp
 85 90 95

tgg gat gta ctg ttg tac aag gcc aag gtg agg aag gaa tca gcg ggt 336
 Trp Asp Val Leu Leu Tyr Lys Ala Lys Val Arg Lys Glu Ser Ala Gly
 100 105 110

ggg gta cca tca gtg agc ttt aca tgg gac gaa ccc cta tac ctg aag 384
 Gly Val Pro Ser Val Ser Phe Thr Trp Asp Glu Pro Leu Tyr Leu Lys
 115 120 125

cat ctg ctc acc tct gtc ggt aaa ata gac gcc agg tcc ctc ata caa 432
 His Leu Leu Thr Ser Val Gly Lys Ile Asp Gly Arg Ser Leu Ile Gln
 130 135 140

tac att ggt gcc gtt gga aat ggt att gta aca ccg aaa ggt act atc 480
 Tyr Ile Gly Gly Val Gly Asn Gly Ile Val Thr Pro Lys Gly Thr Ile
 145 150 155 160

gtg ttt cca gtt cag gtt tta aac acc aac aaa tcc gtc atg aac atg 528
 Val Phe Pro Val Gln Val Leu Asn Thr Asn Lys Ser Val Met Asn Met

Trans-Sialidasen.ST25.txt

165					170					175						
ctt	ctg	tat	tca	agt	aac	gac	gga	aaa	acc	tgg	gag	ttc	agc	aaa	act	576
Leu	Leu	Tyr	Ser	Ser	Asn	Asp	Gly	Lys	Thr	Trp	Glu	Phe	Ser	Lys	Thr	
			180					185					190			
tcc	aca	ccc	gcg	ggc	aca	act	gag	gcc	tcc	ctt	gtt	tgg	tgg	gat	gga	624
Ser	Thr	Pro	Ala	Gly	Thr	Thr	Glu	Ala	Ser	Leu	Val	Trp	Trp	Asp	Gly	
		195					200					205				
caa	cta	ctt	ctc	aca	agc	aga	aca	act	ccg	gat	gtc	ggc	agc	cgc	aaa	672
Gln	Leu	Leu	Leu	Thr	Ser	Arg	Thr	Thr	Pro	Asp	Val	Gly	Ser	Arg	Lys	
	210					215					220					
gta	tat	tta	aca	agc	gac	ctc	gga	act	tca	tgg	aat	gaa	gcg	atc	gga	720
Val	Tyr	Leu	Thr	Ser	Asp	Leu	Gly	Thr	Ser	Trp	Asn	Glu	Ala	Ile	Gly	
	225				230					235					240	
agt	atc	tct	cgt	gta	att	ggc	aac	tcg	cgg	tac	cgt	aac	gat	cct	ggg	768
Ser	Ile	Ser	Arg	Val	Ile	Gly	Asn	Ser	Arg	Tyr	Arg	Asn	Asp	Pro	Gly	
				245					250					255		
agg	tca	ggt	agc	tca	att	gcc	ata	act	gtg	gag	gga	gta	ccg	gtg	atg	816
Val	Ser	Gly	Ser	Ser	Ile	Ala	Ile	Thr	Val	Glu	Gly	Val	Pro	Val	Met	
			260					265					270			
ctg	att	acc	cac	ccg												831
Leu	Ile	Thr	His	Pro												
			275													

<210> 4
 <211> 277
 <212> PRT
 <213> Trypanosoma congolense

<400> 4

Phe Arg Ile Pro Ser Leu Val Glu Ile Asp Gly Val Leu Ile Ala Thr
 1 5 10 15

Phe Asp Thr Arg Tyr Leu Arg Ala Ser Asp Ser Ser Leu Ile Asp Thr
 20 25 30

Met Lys Tyr Ser Ala Asp Gln Gly Lys Thr Trp Lys Thr Glu Ile
 35 40 45

Ile Ile Lys Asn Ala Arg Leu Thr Asp Asn Phe Ser Arg Val Val Asp
 50 55 60

Pro Thr Val Val Val Lys Gly Asp Asn Leu Phe Ile Phe Val Gly Arg
 65 70 75 80

Tyr Asn Thr Ser Ser Ala Pro Trp Val Trp Gln Glu Asn Gly Lys Asp
 85 90 95

Trp Asp Val Leu Leu Tyr Lys Ala Lys Val Arg Lys Glu Ser Ala Gly
 100 105 110

Gly Val Pro Ser Val Ser Phe Thr Trp Asp Glu Pro Leu Tyr Leu Lys
 115 120 125

Trans-Sialidasen.ST25.txt

His Leu Leu Thr Ser Val Gly Lys Ile Asp Gly Arg Ser Leu Ile Gln
130 135 140

Tyr Ile Gly Gly Val Gly Asn Gly Ile Val Thr Pro Lys Gly Thr Ile
145 150 155 160

Val Phe Pro Val Gln Val Leu Asn Thr Asn Lys Ser Val Met Asn Met
165 170 175

Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Asp Gly Lys Thr Trp Glu Phe Ser Lys Thr
180 185 190

Ser Thr Pro Ala Gly Thr Thr Glu Ala Ser Leu Val Trp Trp Asp Gly
195 200 205

Gln Leu Leu Leu Thr Ser Arg Thr Thr Pro Asp Val Gly Ser Arg Lys
210 215 220

Val Tyr Leu Thr Ser Asp Leu Gly Thr Ser Trp Asn Glu Ala Ile Gly
225 230 235 240

Ser Ile Ser Arg Val Ile Gly Asn Ser Arg Tyr Arg Asn Asp Pro Gly
245 250 255

Gly Ser Gly Ser Ser Ile Ala Ile Thr Val Glu Gly Val Pro Val Met
260 265 270

Leu Ile Thr His Pro
275

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☒ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.